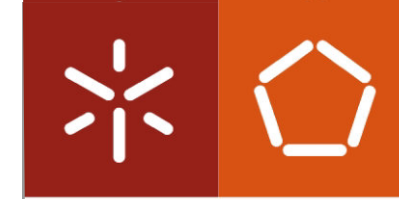




Otimização de metodologias para o estudo de interações
entre nanopartículas e *Staphylococcus aureus*

Diana Maria Martins Sequeira

Uminho | 2013

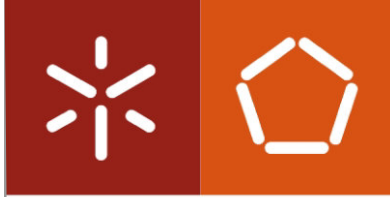


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Diana Maria Martins Sequeira

**Otimização de metodologias para o
estudo de interações entre
nanopartículas e *Staphylococcus aureus***

Outubro de 2013



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Diana Maria Martins Sequeira

**Otimização de metodologias para o
estudo de interações entre
nanopartículas e *Staphylococcus aureus***

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioengenharia

Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Cláudia Sousa
e
Doutor Dmitri Petrovykh

Outubro de 2013

Declaração

Nome: Diana Maria Martins Sequeira

Nº Cartão Cidadão: 13584195

Correio eletrónico: dianasequeira1989@hotmail.com

Título da dissertação em PT: Otimização de metodologias para o estudo de interações entre nanopartículas e *Staphylococcus aureus*

Título da dissertação em EN: Optimization of methodologies for the study of interactions between nanoparticles and *Staphylococcus aureus*

Orientador: Doutora Cláudia Sousa

Co-orientador: Doutor Dmitri Petrovykh

Curso: Mestrado em Bioengenharia

Ano de conclusão: 2013

Disponibilização do trabalho para acesso exclusivo na Universidade do Minho durante o período de um ano, sendo que após esse tempo autorizo o acesso universal.

Universidade do Minho, __/__/____

Assinatura:

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado foi possível devido à colaboração e ao contributo, direto ou indireto, de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

À Doutora Cláudia Sousa, agradeço o modo empenhado e estimulador com que me orientou em todas as fases do trabalho experimental, assim como os conselhos e ideias importantes que contribuíram para a realização desta dissertação. Um agradecimento muito especial por todo o apoio e incentivo, por todas as palavras de amizade principalmente nos momentos em que nada parecia correr bem e por toda a paciência para corrigir a dissertação.

Ao Doutor Dmitri Petrovykh, agradeço todo o apoio, motivação e a constante disponibilidade demonstrada na orientação e no esclarecimento de dúvidas. Um agradecimento muito especial pelos conhecimentos, conselhos e sugestões transmitidas através do seu profissionalismo, assim como toda a paciência em me ensinar todo um conjunto de novas ideias ao longo desta dissertação.

Ao Doutor Senentxu Lanceros-Méndez, agradeço pelas sugestões oportunas e pela disponibilidade imediata no esclarecimento de dúvidas no decorrer desta dissertação.

Uma especial consideração à **Professora Doutora Rosário Oliveira**, que infelizmente já não está entre nós, mas que influenciou a minha vida de uma forma muito positiva. Agradeço também o apoio e a motivação para a seleção deste tema que imediatamente me interessou e pela orientação inicial nesta dissertação.

À Doutora Mariana Henriques, agradeço a disponibilidade demonstrada para me orientar e as sugestões sugeridas para a realização desta dissertação.

Ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho por me ter disponibilizado as condições necessárias à execução deste meu trabalho.

A todos os colegas do LMA pelo excelente ambiente de trabalho que proporcionaram. Um agradecimento especial à Joana Sampaio, Elísia Lopes, Mário Sousa, Deivid William, Tatiana Cereja, Joana Cunha e Patrícia Alves sem exceção, pela ajuda, camaradagem, boa disposição e pelos momentos de descontração que fizeram que desde o primeiro momento me sentisse parte integrante deste laboratório.

Esta dissertação representa o culminar de uma fase muito importante da minha vida. Como tal, não posso deixar de agradecer às pessoas mais importantes que, embora não estando diretamente ligadas a este trabalho, foram um grande apoio para mim, contribuindo em muito para o meu sucesso e para a minha realização pessoal.

Aos **meus pais e à minha irmã** agradeço por todo o apoio, incentivo, confiança e motivação ao longo destes anos. Agradeço os valores transmitidos, os meios que sempre me proporcionaram, a força e a coragem que sempre me incutiram para seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis. Todas as palavras são poucas para vos agradecer!

Ao Filipe, pelo carinho e compreensão, por todo o apoio e, claro, pelo incentivo e felicidade que me tem dado ao longo destes anos.

Aos meus amigos, **Tânia Rodrigues**, aluna do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica da Universidade do Minho, **Miguel Ribeiro**, aluno do Mestrado Integrado em Medicina da Universidade do Minho e à **Salomé Fernandes**, aluna de Doutoramento da Universidade do Porto pela ajuda e apoio incondicional que me deram nesta fase final.

A todos os outros amigos, mas em especial à **Sofia Silva**, que direta ou indiretamente contribuiu para a realização desta dissertação.

RESUMO

Para compreender as interações entre nanopartículas (NPs) e células bacterianas é importante a capacidade de observar diretamente NPs a interagirem com as células. Infelizmente, não estão disponíveis métodos para tal observação direta em solução, onde NPs e as células são misturadas em experiências típicas de nanomedicina. A gama do campo de observação e a resolução de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) torna-a num excelente método na obtenção de imagens para a observação de NPs a interagirem com as células bacterianas. Para analisar as interações que ocorrem em solução, devem desenvolver-se protocolos que nos permita obter essa informação a partir de imagens de SEM de amostras secas.

Neste trabalho, foi desenvolvido um protocolo para a caracterização microscópica de amostras de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) em interação com a bactéria *S. aureus*. Para desenvolver o protocolo e proporcionar uma interpretação do comportamento em solução a partir das imagens de SEM, os dois componentes das amostras foram numa primeira fase caracterizados separadamente, utilizando métodos de análise de amostras em solução. Combinar a informação, particularmente sobre a centrifugação das NPs e das células, a partir destes estudos em solução, proporcionou uma base para um método eficaz de separação das SPIONs misturadas com as células, após um período de interação controlado em solução, para a caracterização por SEM.

A caracterização de SPIONs em solução foi focada em atingir os limites da estabilidade coloidal, em função do revestimento das NPs e dos parâmetros da solução, sob centrifugação até 8000 rpm. Para cinco tipos de SPIONs em quatro soluções diferentes foi observada sedimentação abrupta. Para SPIONs revestidas com ácido oleico e tratadas com *tetramethylammonium hydroxide* (TMAOH), o limite superior de estabilidade (6000 rpm) foi encontrado em água destilada.

A quantificação da eficiência da centrifugação para *S. aureus* em água destilada foi mais desafiante, uma vez que tanto as medições por densidade ótica (DO) como por contagem de unidades formadoras de colónias (UFCs) provaram ser inadequadas para as amostras com baixa concentração celular ($DO \approx 0,10$), apropriadas para a observação por SEM. O estabelecimento do limite de sedimentação acima das 3000 rpm para as amostras com $DO \approx 0,60$ forneceu a base para a separação das SPIONs livres das células em amostras mistas.

No protocolo final, foi permitida a interação entre as SPIONs e as bactérias *S. aureus* e de seguida as células com NPs ligadas foram sedimentadas por centrifugação e observadas por SEM, enquanto as SPIONs livres permaneceram no sobrenadante. A base físico-química deste protocolo torna-o num método promissor para o estudo de outras combinações de células e NPs.

ABSTRACT

An important step toward understanding interactions between nanoparticles (NPs) and bacterial cells is the ability to directly observe NPs interacting with cells. Unfortunately, methods are not available for such direct observation in solution, where NPs and cells are mixed in typical nanomedicine experiments. The range and resolution of Scanning Electron Microscopy (SEM) make it an excellent method for imaging NPs interacting with bacterial cells. Protocols must be developed to analyze the interactions that occur in solution, however they should be based on SEM of dried samples.

In this work, a protocol has been developed for SEM characterization of samples of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) interacting with *S. aureus* bacteria. To develop the protocol and to provide an interpretation of solution behavior from SEM images, the two components of the samples first have been characterized separately using solution methods. The combined information, particularly about the centrifugation of NPs and cells, from those solution studies provided a basis for an effective method of separating the mixed SPIONs and cells samples after a controlled interaction period in solution for characterization by SEM.

The solution characterization of SPIONs focused on establishing the limits of their colloidal stability under centrifugation up to 8000 rpm as a function of the NP coating and solution parameters. Abrupt sedimentation thresholds were observed for five types of SPIONs in four different solutions, with the highest stability limit (6000 rpm) found for oleic-acid coated and tetramethylammonium hydroxide (TMAOH) – treated SPIONs in distilled water.

Quantifying the centrifugation efficiency for *S. aureus* in distilled water was more challenging, as both optical density (OD) and colony forming unit (CFU) measurements proved inadequate for the low-concentration samples ($OD \approx 0.10$) suitable for SEM imaging. Establishing a sedimentation threshold above 3000 rpm for samples with $OD \approx 0.60$ provided the basis for separation of free SPIONs from cells in mixed samples.

In the final protocol, the SPIONs and *S. aureus* bacteria were allowed to interact and then cells with attached NPs were pelleted by centrifugation for SEM imaging, while free SPIONs remained in the supernatant. The physico-chemical basis of this protocol makes it a promising method for studying other NP-cell combinations.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
NOMENCLATURA	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
ENQUADRAMENTO	xxi
OBJETIVO DA DISSERTAÇÃO	xxii
ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	xxii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Introdução Geral.....	3
1.2 <i>Staphylococcus</i>	8
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> – De Comensal a Agente Patogénico	9
1.3 Resistência Bacteriana a Antibióticos	10
1.4 Estratégias no Combate à Resistência Bacteriana	11
1.5 Estudos de Interação entre SPIONs e Células Bacterianas	13
1.6 Metodologias de Análise em Solução	14
1.6.1 Densidade Ótica.....	14
1.6.2 Unidades Formadoras de Colónias	15
1.6.3 Processo de Centrifugação	15
1.7 Análise de Amostras Biológicas por Microscopia Eletrónica de Varrimento ..	16
CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE COLOIDAL DE NANOPARTÍCULAS EM SOLUÇÃO.....	19
2.1 Introdução.....	21

2.2	Materiais e Métodos.....	23
2.2.1	Nanopartículas Superparamagnéticas de Óxido de Ferro	23
2.2.2	Preparação de Soluções	24
2.2.3	Determinação da Estabilidade Coloidal das SPIONs	24
2.3	Resultados e Discussão	25
2.3.1	Precipitação Estática das SPIONs	26
2.3.2	Precipitação de SPIONs por Centrifugação	27
2.4	Conclusão.....	30
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> EM SOLUÇÃO.....		33
3.1	Introdução.....	35
3.2	Materiais e Métodos.....	38
3.2.1	Microrganismo.....	38
3.2.2	Meios de Cultura	38
3.2.3	Condições de Armazenamento de <i>Staphylococcus aureus</i> e Reativação Celular.....	39
3.2.4	Preparação de Soluções	40
3.2.5	Avaliação da Viabilidade Celular	40
3.2.6	Correlação Entre Métodos: Densidade Ótica e Unidades Formadoras de Colónias	41
3.2.7	Eficiência da Centrifugação de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
3.2.8	Análise Estatística	42
3.3	Resultados e Discussão	42
3.3.1	Avaliação da Viabilidade Celular	42
3.3.2	Correlação Entre Métodos: Densidade Ótica e Unidades Formadoras de Colónias	51
3.3.3	Eficiência da Centrifugação de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
3.4	Conclusão.....	64

CAPÍTULO 4 – OBSERVAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS SPIONs e <i>Staphylococcus aureus</i>	
POR MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO.....	67
4.1 Introdução.....	69
4.2 Materiais e Métodos.....	72
4.2.1 Microrganismo.....	72
4.2.2 Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	72
4.2.3 Preparação da solução de SPIONs AO-TMAOH-2.....	73
4.2.4 Preparação da Mistura: Células de <i>S. aureus</i> e AO-TMAOH-2.....	73
4.2.5 Protocolo de Separação de Células de <i>S. aureus</i> e AO-TMAOH-2 livres..	74
4.2.6 Preparação das Amostras para Observação por Microscopia Eletrónica de Varrimento	74
4.2.7 Observação de Amostras por Microscopia Eletrónica de Varrimento	75
4.3 Resultados e Discussão	75
4.4 Conclusão.....	86
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	89
5.1 Conclusão Geral	91
5.2 Contexto e Relevância dos Resultados	92
5.3 Sugestões para Trabalhos Futuros.....	94
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

NOMENCLATURA

Símbolos

p	Nível de significância
R^2	Fator de correlação
\approx	Valor aproximado

Abreviaturas

ANOVA	Análise de variância
AO	Ácido Oleico
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DO	Densidade Ótica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
MSA	<i>Mannitol Salt Agar</i>
NPs	Nanopartículas
PAA	Poli Ácido Acrílico
RPM	Rotações Por Minuto
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SPIONs	<i>Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TMAOH	<i>Tetramethylammonium Hydroxide</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Imagem de SEM representativa de uma amostra com <i>S. aureus</i> e SPIONs.	5
Figura 1.2 – Imagem de SEM representativa do isolamento eficiente de <i>S. aureus</i> e SPIONs ligadas às células.	7
Figura 1.3 – <i>S. aureus</i> em diferentes meios de crescimento.	9
Figura 1.4 – Efeito antimicrobiano das SPIONs no interior de um biofilme na superfície de um biomaterial.	13
Figura 1.5 – Aspeto de diferentes filtros observados por microscopia eletrónica.	17
 Figura 2.1 – Exemplos de mecanismos de estabilização de NPs metálicas.	22
Figura 2.2 – Precipitação estática das PAA-CP-1 em diferentes soluções.	26
 Figura 3.1 – Curva de calibração (DO vs UFC) de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	36
Figura 3.2 – Curvas de calibração (DO vs UFC) de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 possíveis para valores de concentrações celulares mais baixas.	37
Figura 3.3 – Viabilidade celular de <i>S. aureus</i> em água destilada, NaCl 0,45 %, NaCl 0,9 % e PBS 0,01 M, após 1h.	44
Figura 3.4 – Viabilidade celular de <i>S. aureus</i> em água destilada, NaCl 0,45 %, NaCl 0,9 % e PBS 0,01 M, após 24h.	45
Figura 3.5 – Medição de três amostras pela leitura da DO a 640 _{nm}	53
Figura 3.6 – Medição de três amostras pela contagem de UFCs.	54
Figura 3.7 – Formação de <i>pellet</i> de células de <i>S. aureus</i> a diferentes velocidades de centrifugação. Suspensão celular com concentração inicial de DO≈0,60.	57
Figura 3.8 – Formação de <i>pellet</i> de <i>S. aureus</i> em três diferentes velocidades de centrifugação (rpm). Suspensão celular com concentração inicial de DO≈0,60.	59
Figura 3.9 – Formação de <i>pellet</i> de <i>S. aureus</i> em diferentes velocidades de centrifugação (rpm). Suspensão celular com concentração inicial de DO≈0,20.	61
Figura 3.10 – Formação de <i>pellet</i> de <i>S. aureus</i> a diferentes velocidades de centrifugação (rpm). Suspensão celular com concentração inicial de DO≈0,10.	63

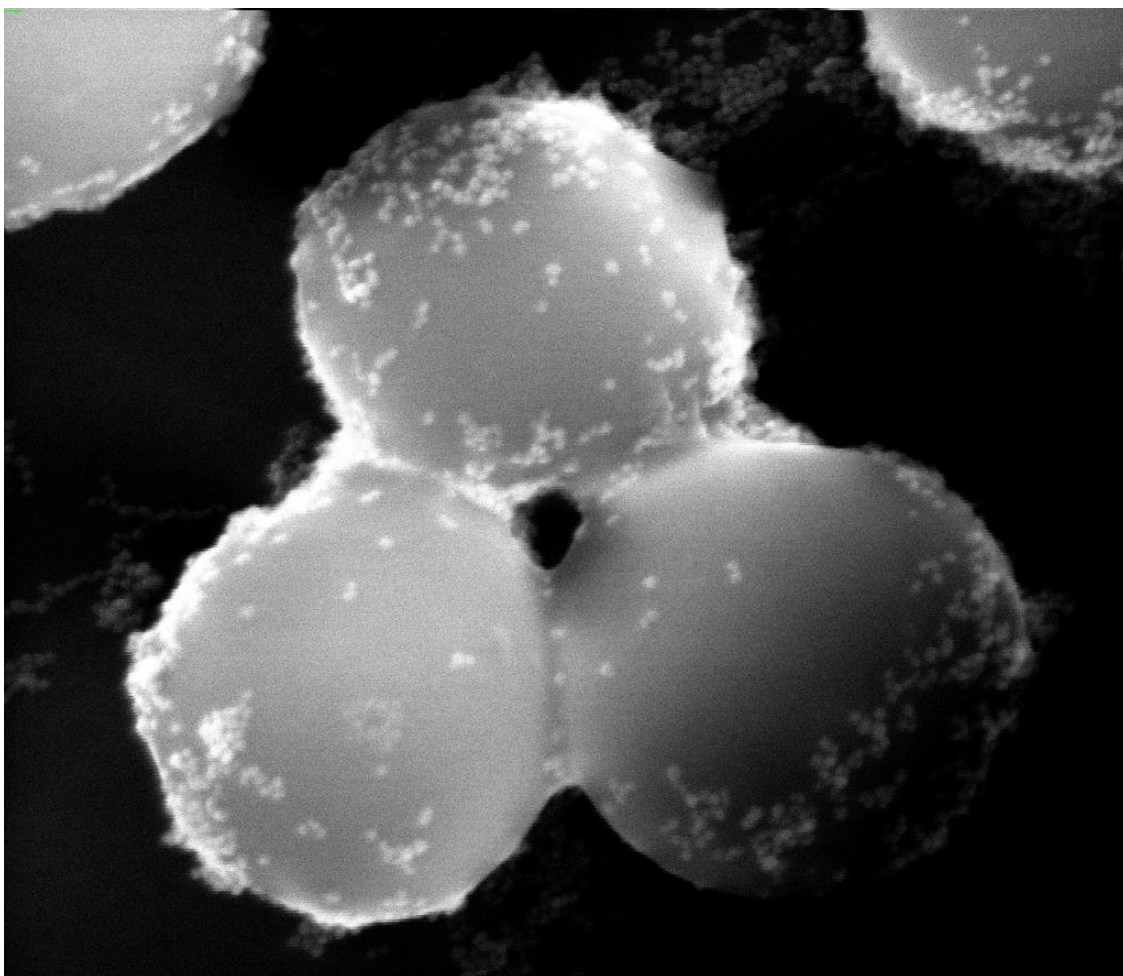
Figura 4.1 – Imagem de SEM de bactérias <i>E.coli</i> e NPs de prata.	69
Figura 4.2 – Imagem de SEM de células de <i>S. aureus</i> revestidas com uma rugosa camada de SPIONs.	71
Figura 4.3 – Formação de <i>pellet</i> de células <i>S. aureus</i> e de SPIONs em função da velocidade de centrifugação (rpm).	72
Figura 4.4 – Imagem de SEM representativa da mistura de células de <i>S. aureus</i> (concentração inicial com DO \approx 0,40) com SPIONs.	76
Figura 4.5 – Imagem de SEM representativa de células de <i>S. aureus</i> na concentração celular ajustada à DO \approx 0,10.	77
Figura 4.6 – Imagens de SEM representativas do sobrenadante da mistura de <i>S. aureus</i> e SPIONs AO-TMAOH-2.	81
Figura 4.7 – Imagens de SEM representativas do <i>pellet</i> da mistura de <i>S. aureus</i> e SPIONs AO-TMAOH-2.	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – SPIONs utilizadas durante o projeto.....	24
Tabela 2.2 – Precipitação das SPIONs (PAA e AO) nas quatro soluções, a diferentes velocidades de centrifugação.	28
Tabela 3.1 – Valores obtidos da contagem de UFCs da suspensão celular incubada 1h em diferentes soluções.....	47
Tabela 3.2 – Valores obtidos da contagem de UFCs da suspensão celular incubada 24h em diferentes soluções.	49
Tabela 3.3 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do <i>pellet</i>	51
Tabela 3.4 – Valores obtidos pela contagem de UFCs da suspensão celular inicial (antes da centrifugação) e valores obtidos pela contagem de UFCs do sobrenadante e do <i>pellet</i>	52
Tabela 3.5 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial ($DO \approx 0,60$) (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do <i>pellet</i> após a centrifugação da suspensão celular a diferentes velocidades.	56
Tabela 3.6 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial ($DO \approx 0,60$) (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do <i>pellet</i> após a centrifugação da suspensão celular a 1000, 4000 e 6000 rpm.	58
Tabela 3.7 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial ($DO \approx 0,20$) (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do <i>pellet</i> após a centrifugação da suspensão celular a diferentes velocidades.	60
Tabela 3.8 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial ($DO \approx 0,10$) (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do <i>pellet</i> após a centrifugação da suspensão celular a diferentes velocidades.	62

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein



“O mundo está perto de perder as suas curas milagrosas ... na ausência de ações corretivas e projetivas urgentes, o mundo caminha para uma era pós-antibiótica, onde infeções que hoje são comuns, deixarão de ter cura e irão, mais uma vez, matar sem esmorecer”.

Margaret Chan

Diretora Geral da Organização Mundial de Saúde (OMS)

Na descoberta de terapias urgentes para que os seres humanos possam beneficiar, é fundamental **compreender, explorar e ampliar** o potencial dos nanomateriais.

ENQUADRAMENTO

A resistência bacteriana aos antibióticos têm-se assumido como um problema grave e complexo na saúde pública. É o resultado do uso excessivo de antibióticos, alterações fenotípicas e genotípicas das células e da capacidade dos microrganismos colonizarem a superfície de dispositivos médicos, formando biofilmes. Bactérias do género *Staphylococcus* são o agente patogénico mais frequentemente isolado em superfícies de dispositivos médicos e a sua disseminação deriva das características físico-químicas da superfície das células, do próprio material, entre outros fatores.

O tratamento de infeções causadas por bactérias é tradicionalmente realizado recorrendo ao uso de antibióticos. Contudo, estes têm-se mostrado cada vez mais ineficazes, impedindo o sucesso do tratamento e conduzindo a uma constante preocupação médica. Algumas alternativas têm sido alvo de investigações, tais como: o revestimento de superfícies de biomateriais, a produção de superfícies muito lisas, e métodos físicos, como a hipertermia magnética que permite direcionar nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (do inglês, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles* (SPIONs)) através de um campo magnético externo causando a lise das células bacterianas planctónicas e de biofilme.

A capacidade dos nanomateriais interagirem com as células bacterianas ainda se encontra pouco fundamentada. Para tal, neste projeto propõe-se otimizar metodologias para estudar a interação de SPIONs e bactérias *Staphylococcus aureus*. Note-se que para este estudo é necessário compreender e caracterizar as células bacterianas em solução, bem como as propriedades físico-químicas das SPIONs. Pretende-se obter um sistema isolado [*S. aureus* + SPIONs], isto é, sem conter SPIONs livres em solução, de forma a permitir a sua correta observação e análise. Numa abordagem mais detalhada, este estudo consiste, numa primeira fase, na caracterização dos diferentes componentes, as células bacterianas e as SPIONs, separadamente e em solução, através de metodologias já existentes. Numa segunda fase, é feita a análise da interação de SPIONs e *S. aureus*. Para uma melhor investigação do sistema [*S. aureus* + SPIONs], a microscopia eletrónica de varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy* (SEM)) apresenta-se como um excelente

método na obtenção de imagens de alta resolução de forma a permitir a observação das SPIONs a interagirem com as células bacterianas.

OBJETIVO DA DISSERTAÇÃO

O principal objetivo do trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação consistiu na otimização de metodologias para o estudo de interações entre nanopartículas e *Staphylococcus aureus*. Os objetivos específicos incluíram: (1) a determinação da estabilidade coloidal das SPIONs, (2) a avaliação da viabilidade celular de *S. aureus* em diferentes soluções, (3) a correlação entre os métodos: leitura da densidade ótica (DO) e contagem de unidades formadoras de colónias (UFCs), (4) o estudo da eficiência da centrifugação de *S. aureus* e (5) o estudo da eficiência da centrifugação como método de isolamento do sistema [*S. aureus* + SPIONs].

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está dividida em seis capítulos. No Capítulo 1 é apresentada a introdução geral sob forma de contextualização do trabalho desenvolvido. Também é apresentada uma revisão bibliográfica dos métodos que têm sido adotados para a caracterização das células bacterianas e das nanopartículas, assim como as estratégias que têm sido estudadas para minimizar/prevenir as infeções bacterianas. No Capítulo 2 e Capítulo 3 é apresentado o estudo da caracterização das SPIONs e *S. aureus* separadamente, em solução. No Capítulo 4 é apresentada a informação combinada dos Capítulos anteriores para desenvolver um protocolo de isolamento do sistema [*S. aureus* + SPIONs]. No Capítulo 5 são apresentadas as conclusões gerais, a contextualização e relevância dos resultados obtidos, e fornecidas algumas sugestões para trabalhos futuros. O Capítulo 6 compreende as referências bibliográficas.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Introdução Geral

A resistência bacteriana aos antibióticos é um importante problema na prática clínica. Os mecanismos responsáveis pela resistência das bactérias aos antibióticos podem estar relacionados com o uso abusivo e inadequado de antibióticos (Opas, 1999; Fauci, 2001; Norrby, 2005; Marques, 2006), alterações do fenótipo e genótipo das células bacterianas (Veiga, 1984; Donlan e Costerton, 2002; Rice e Bonomo, 2005; Dzidic, Suskovic e Kos, 2007; Todar, 2012), e com a capacidade dos microrganismos aderirem à superfície de dispositivos médicos acabando com frequência por formarem biofilmes, que são comunidades biológicas com um elevado grau de organização, onde as bactérias formam agregados estruturados, coordenados e funcionais (Donlan, 2001). Estas comunidades desempenham um papel preponderante na colonização de cateteres, sondas, implantes, válvulas cardíacas, lentes de contacto, entre outros (Sousa *et al.*, 2011), tornando-se uma fonte de disseminação para o organismo. A etiologia das infeções associadas a dispositivos implantáveis é complexa e pode ser influenciada por uma série de variáveis, tais como: o tipo de dispositivo, a região anatómica da inserção, se é uma inserção totalmente interna ou percutânea (Campoccia *et al.*, 2009), a quantidade e o tipo de células no líquido ao qual o dispositivo está exposto, a taxa de fluxo de líquido através do dispositivo, e as características físico-químicas da superfície das células e do próprio material (Hirai, 1991; Mizunoe *et al.*, 2000; Donlan, 2001; Boulange - Petermann *et al.*, 2004; Donskey, 2004).

Bactérias do género *Staphylococcus*, nomeadamente a espécie *Staphylococcus aureus*, constituem o agente patogénico mais frequentemente isolado em superfícies de biomateriais infetados, afetando muitos pacientes que necessitam destes dispositivos para a sua sobrevivência (Donlan, 2001). A eficiência da disseminação de *S. aureus* deve-se, em parte, à grande versatilidade deste microrganismo para se adaptar rapidamente a diferentes ambientes, muitas vezes hostis devido ao pH, humidade, pressão osmótica ou deficiência de nutrientes, possibilitando não só a colonização do Homem como do ambiente ao seu redor, criando reservatórios de células aptas a colonizar outros indivíduos (Cepeda *et al.*, 2005; Kniehl *et al.*, 2005).

O tratamento de infecções causadas por *S. aureus* é convencionalmente realizado utilizando agentes antimicrobianos, nomeadamente antibióticos. Contudo, estes têm demonstrado frequentemente a sua ineficácia devido ao aparecimento de estirpes bacterianas multirresistentes. Estas estirpes têm a capacidade de sobreviver a elevadas doses de antibióticos, sob determinadas condições resultando num crescimento seletivo de bactérias resistentes. (DeFlaun e Levy, 1989; Tenover e Hughes, 1996). De forma a combater esta resistência, várias alternativas aos antibióticos têm sido propostas, tais como: a modificação química das superfícies dos dispositivos médicos implantados através de revestimentos contendo propriedades antissépticas (Fux *et al.*, 2005; Kumon *et al.*, 2001; Von Eiff *et al.*, 2005), a alteração da rugosidade das superfícies como, por exemplo, a produção de superfícies muito lisas (Camargo *et al.*, 2009), e métodos físicos como a hipertermia magnética (HM) (Rodrigues *et al.*, 2012). A HM permite o direcionamento de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) através de um campo magnético externo com o objetivo de causar a lise das células bacterianas planctónicas e de biofilme (Rodrigues *et al.*, 2012). As SPIONs têm sido amplamente exploradas na biomedicina devido às suas propriedades físico-químicas (Morones *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007), que são cruciais para permitirem a interação com as células (Jordan *et al.*, 2001; Horák, 2005; Gupta and Gupta, 2005; Neuberger *et al.*, 2005; Mohammad *et al.*, 2010). Por exemplo, o revestimento polimérico da nanopartícula (NP) permite torná-la estável e podendo funcionar como suporte de biomoléculas (Jain *et al.*, 2008).

Para projetar nanoestruturas capazes de interagir com as células bacterianas é necessário analisar e compreender as interações nano-bio, isto é, o que acontece quando se misturam NPs, como as SPIONs, com os sistemas biológicos. (Alexandre *et al.*, 2012). O tamanho de NPs inferior ao das células bacterianas conduz a uma interessante investigação biomédica, pois esta diferença de tamanhos permite a eventual penetração nas células (Ravishankar *et al.*, 2011).

Na **Figura 1.1** é possível observar o resultado da mistura de SPIONs e células de *S. aureus*.

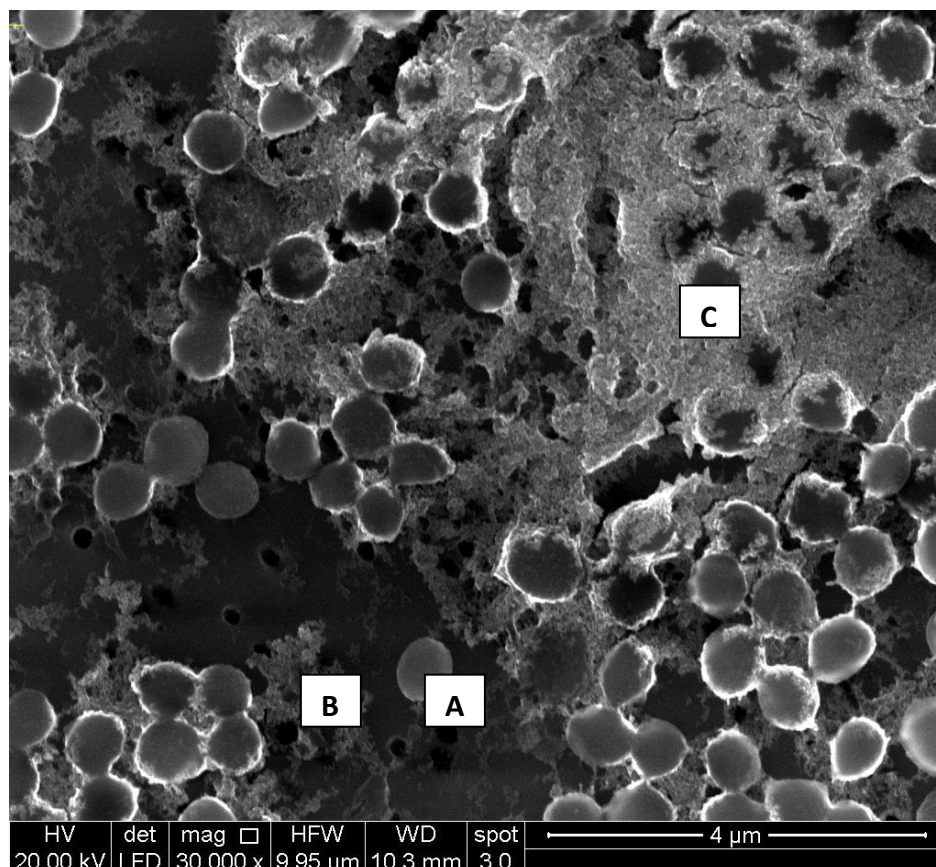


Figura 1.1 – Imagem de SEM representativa de uma amostra com *S. aureus* e SPIONs.

Na imagem é possível observar células de *S. aureus* sem SPIONs (A), SPIONs livres (B) e SPIONs depositadas sobre as células (C), numa amostra típica de uma solução contendo células de *S. aureus* e SPIONs. Figura cedida por cortesia de Cláudia Sousa (Universidade do Minho) em colaboração com Dmitri Petrovykh (Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia – INL).

A observação de imagens como a da **Figura 1.1**, que demonstra a mistura das SPIONs com as células de *S. aureus*, suscita várias questões:

As SPIONs estão ligadas e/ou internalizadas nas células?

As SPIONs estão a interagir com as células?

De forma a dar resposta a estas perguntas é crucial isolar/separar as células que se encontram a ligadas às SPIONs, das SPIONs livres em solução e, tentar compreender se existe interação do sistema [*S. aureus* + SPIONs] de forma aprofundada. Metodologias que permitam a separação dos diferentes componentes da amostra devem ser devidamente desenvolvidas e validadas antes do componente de interesse [*S. aureus* + SPIONs] poder ser caracterizado.

A separação de células bacterianas das SPIONs livres é um processo bastante importante, mas difícil de ser implementado. No presente trabalho, a abordagem para este desafio é baseada em métodos existentes para caracterizar as células bacterianas e as NPs separadamente. Contudo, os métodos que são tradicionalmente utilizados para a caracterização de ambos os componentes em separado, não são facilmente aplicados quando estes estão em conjunto. Para a caracterização das propriedades físico-químicas das NPs são utilizadas diversas técnicas, entre as quais: *Scanning Electron Microscopy* (SEM), uma ferramenta essencial que fornece informação quanto ao número, tamanho e forma das NPs, e se estas se encontram agregadas (Laurent *et al.*, 2011; Subbiahdoss *et al.*, 2012), *Dinamic Light Scattering* (DLS), uma técnica que permite avaliar o tamanho médio das NPs, (Mahmoudi *et al.*, 2011), e a centrifugação, que permite a separação de NPs com base em diferentes tamanhos, formas e densidades (Vivek Sharma *et al.*, 2009).

Relativamente aos métodos comumente utilizados para a caracterização das culturas microbianas, a leitura da densidade ótica (DO) é uma técnica muito utilizada em laboratórios de investigação (Ivan Sondi e Branka Salopek-Sondi, 2004). Este método permite a monitorização do crescimento bacteriano através da turbidez, sendo o método mais simples e rápido para obter resultados. Contudo, este método tem como desvantagem o facto de não permitir a distinção de células viáveis das não viáveis (Assis, 2007). Para ser possível a determinação de células viáveis, normalmente recorre-se à técnica de contagem de unidades formadoras de colónias (UFCs) (Hill, 1908; Ferreira e Sousa, 2000; Ivan Sondi e Branka Salopek-Sondi, 2004).

Dado que a caracterização de células bacterianas com NPs está ainda muito pouco consolidada, os métodos referidos anteriormente são importantes neste projeto para possibilitar o desenvolvimento de uma metodologia eficaz na separação/isolamento do sistema [*S. aureus* + SPIONs]. O método proposto para a separação/isolamento do sistema incide na determinação da estabilidade coloidal de SPIONs em diferentes soluções (soluções comumente usadas em ensaios que manipulam células bacterianas), através da precipitação estática e de testes de centrifugação conseguindo, deste modo, selecionar a solução e a SPION com melhores propriedades físico-químicas para a posterior mistura com as células bacterianas. Numa segunda etapa, o objetivo consiste na avaliação da viabilidade celular de *S.*

aureus em quatro soluções e determinar a eficiência de centrifugação para células de *S. aureus*. O intuito de testar o efeito da centrifugação para ambos os componentes prende-se com a compreensão do seu comportamento em solução, separadamente, de modo a seleccionar o limiar de velocidades de centrifugação (*threshold*) para as NPs e para as bactérias. Com a otimização destas metodologias é possível desenvolver um protocolo de modo a isolar eficientemente [*S. aureus* + SPIONs], como se pode visualizar na **Figura 1.2**.

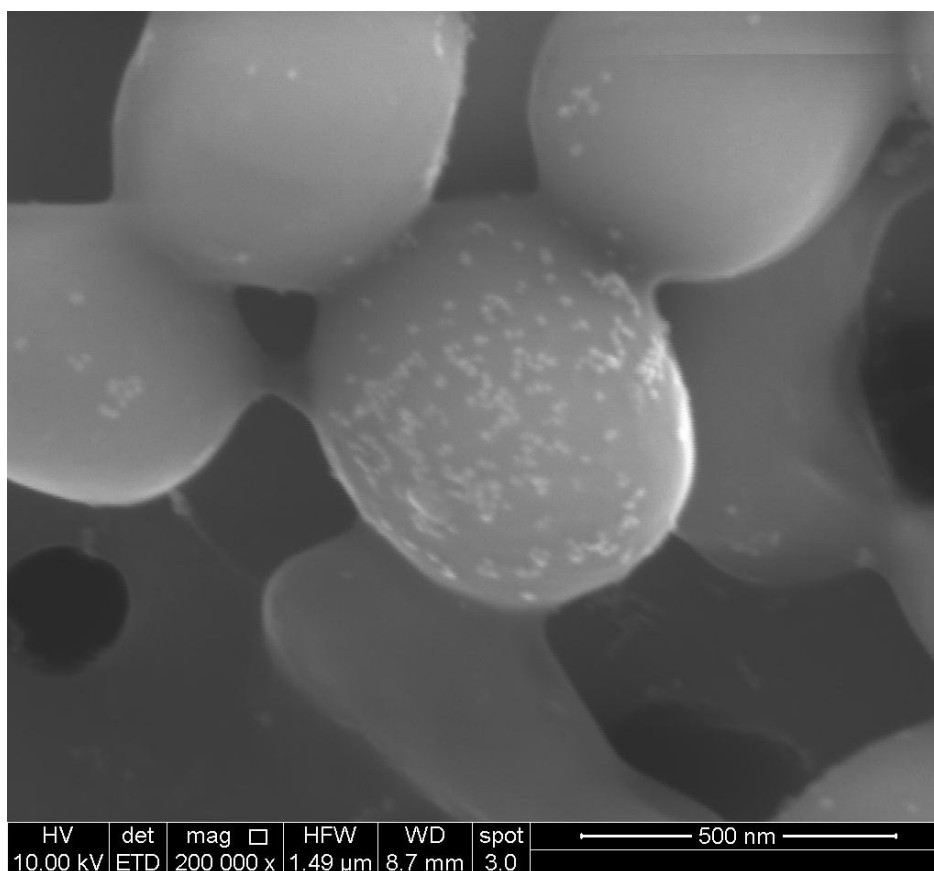


Figura 1.2 – Imagem de SEM representativa do isolamento eficiente de *S. aureus* e SPIONs ligadas às células. Na imagem é possível observar a separação eficiente das células de *S. aureus* das SPIONs livres. Figura cedida por cortesia de Cláudia Sousa (Universidade do Minho) em colaboração com Dmitri Petrovykh (INL).

O SEM é rotineiramente utilizado para a obtenção de imagens de alta resolução permitindo uma investigação mais aprofundada na identificação das propriedades das NPs (Lead e Wilkinson, 2006; Domingos *et al.*, 2009; Krishna *et al.*, 2011; Laura *et al.*, 2013) assim como das características morfológicas das células bacterianas (Tani *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 2003; Bergmans *et al.*, 2005; Josiane *et al.*, 2006; Kaivosoja *et al.*, 2012). Apesar do SEM não permitir a observação e análise de amostras em solução,

através da interpretação do que é observado nas imagens é possível compreender, ou pelo menos recolher informações cruciais sobre o que ocorre em solução.

Os resultados obtidos nas diferentes experiências realizadas no presente projeto possibilitam a definição de parâmetros importantes para a obtenção de um protocolo de preparação de amostras de células de *S. aureus* e SPIONs, essencial para ajudar a compreender como as propriedades das SPIONs influenciam as interações nano-bio.

S. aureus é a bactéria escolhida para este estudo uma vez que é reconhecida como uma das principais causas de infeções nosocomiais associadas a dispositivos médicos implantáveis (Sousa *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2002). Por outro lado, o seu pequeno diâmetro (0,50 μm – 1,50 μm) (Kloos e Bannerman, 1994; Ferreira e Sousa, 2000; Harris *et al.*, 2002) aproxima-se do intervalo de tamanhos de agregados de NPs ou grandes NPs, permitindo que métodos de microscopia e espectroscopia possam ser aplicados para estudar o sistema [*S. aureus* + SPIONs].

Nas subsecções seguintes desta introdução descreve-se, mais detalhadamente, o problema da resistência bacteriana, que constituiu uma das motivações para este trabalho, assim como informação adicional sobre *S. aureus*, as SPIONs, e as metodologias tradicionalmente utilizadas para a sua caracterização.

1.2 *Staphylococcus*

De origem etimológica grega, o género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*. É uma bactéria gram-positiva e apresenta-se em diversas formas, desde isolada, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupadas irregularmente (com aspeto semelhante a um cacho de uvas) (Ferreira e Sousa, 2000; Farmer *et al.*, 2003; Beers *et al.*, 2008). É constituída por uma parede celular contendo peptidoglicanos, proteína A e ácidos teicóicos, sendo limitada interiormente pela membrana citoplasmática e exteriormente pela cápsula polissacarídea não esporulada. Possui um diâmetro compreendido entre os 0,50 μm e os 1,50 μm e é uma bactéria imóvel e anaeróbia facultativa (Kloos e Bannerman, 1994; Ferreira e Sousa, 2000; Harris *et al.*, 2002).

S. aureus é um microrganismo de fácil cultivo e pouco exigente a nível nutritivo. Os meios de crescimento mais comuns são o caldo ou agar simples, *Tryptic Soy Agar* (TSA) (**Figura 1.3A**). A temperatura ótima de crescimento (temperatura à qual a taxa

específica de crescimento é máxima) situa-se entre os 35 e 37 °C. Quanto aos valores de pH, esta bactéria cresce entre 4,5 e 9,3 e apresenta uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com valores de pH entre 6,0 e 7,0. As colónias crescidas em placa, após 18–24 h de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes (Harris *et al.*, 2002). A coloração dessas colónias varia desde cinza ao amarelo-dourado, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado (Ferreira e Sousa, 2000; Farmer *et al.*, 2003; Beers *et al.*, 2008). Um meio importante para a identificação de *S. aureus* é o *Mannitol Salt Agar* (MSA) (**Figura 1.3B**). O meio MSA é um meio seletivo para esta espécie, uma vez que *S. aureus* consegue fermentar manitol produzindo ácido láctico (Ferreira e Sousa, 2000; Farmer *et al.*, 2003).

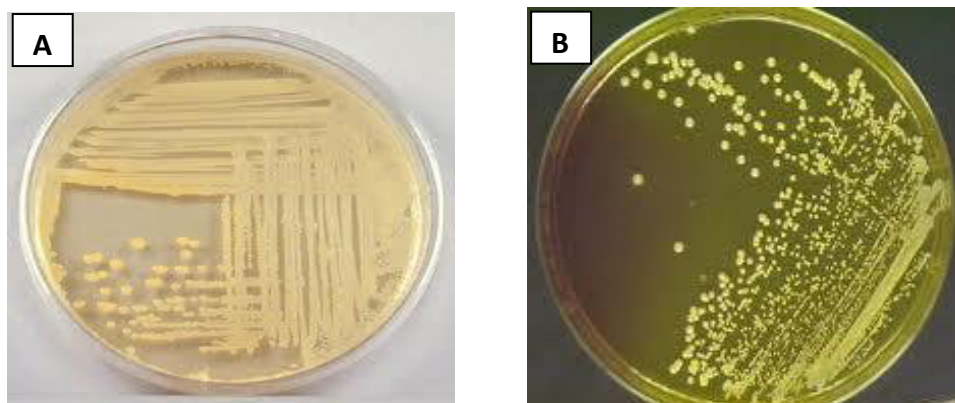


Figura 1.3 – *S. aureus* em diferentes meios de crescimento. Crescimento de *S. aureus* no meio de cultura TSA (A) e no meio seletivo MSA (B). Figura adaptada de <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/msasa.html>

1.2.1 *Staphylococcus aureus* – De Comensal a Agente Patogénico

S. aureus faz habitualmente parte da flora normal do ser humano, pelo que cerca de 30 % dos adultos saudáveis são portadores (Simor e Daneman, 2009). Contudo, *S. aureus* foi reconhecido como agente patogénico pela primeira vez em 1880 por Sir Alexander Ogston (Gordon e Lowy, 2008). A sua virulência foi constatada em 1941 quando Skinner e Keefer reportaram uma taxa de mortalidade de 82 % associada a bacteremias provocadas por *S. aureus* em 122 pacientes no hospital da cidade de Boston (Archer, 1998). Desde então, *S. aureus* foi considerado um agente patogénico que pode provocar epidemias de doenças invasivas, apesar de ser uma bactéria

comensal. Ao longo dos últimos 100 anos, *S. aureus* tem provocado ciclos de focos de infeções em hospitais e na comunidade (Shinefield, 2009).

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, uma vez que tem a capacidade de resistir à dissecação e a temperaturas baixas, podendo permanecer viável por longos períodos em diversos tecidos do corpo humano. No entanto, os locais de maior incidência são as glândulas sebáceas, glândulas apócrinas e fossas nasais (Simor e Daneman, 2009). A colonização assintomática por *S. aureus* é comum e surge como um pré-requisito para o desenvolvimento de infeção (Simor e Daneman, 2009). *S. aureus* é frequentemente isolado em superfícies de dispositivos médicos como cateteres, sondas, implantes, válvulas cardíacas, lentes de contacto, entre outros (Sousa *et al.*, 2011), e a sua disseminação pelo organismo deriva das características físico-químicas da superfície das células, do tipo de dispositivo, da região anatómica da inserção, e se é uma inserção interna ou percutânea (Campoccia *et al.*, 2009). A maioria das infeções por *S. aureus* é desencadeada por fonte endógena, apesar das fontes exógenas também constituírem uma fonte de infeção para indivíduos hospitalizados. Em 1960, Wolinsky demonstrou que a via de transmissão em ambiente hospitalar mais comum é, de facto, promovida pelas mãos dos profissionais de saúde (Shinefield, 2009). Portanto, *S. aureus* é uma bactéria comensal que se pode converter num agente patogénico oportunista e cujas circunstâncias determinam o aparecimento de uma variedade de infeções graves. Estas infeções incluem pneumonia, mastites, infeções dermatológicas, osteomielites, endocardites e até intoxicações alimentares (Davey e O'Toole, 2000).

1.3 Resistência Bacteriana a Antibióticos

As doenças infecciosas sempre foram um problema de saúde pública mundial, e o aparecimento da terapia com antibióticos trouxe um notável progresso ao tratamento das mesmas (Opas, 1999; Tavares, 1999; Abrantes, 2003; Mevius, 2005; Marques, 2006). Porém, desde a utilização dos primeiros antibióticos que existem relatos sobre a resistência bacteriana e, inicialmente, devido ao pouco conhecimento existente sobre os mecanismos pelos quais os microrganismos poderiam tornar-se resistentes, subestimou-se a importância destes relatos (Kunin, 1990; Tenover, 2001; Norrby, 2005). Atualmente constata-se que a resistência bacteriana é bem mais complexa do

que se pensava e ocorre com frequência. Uma das principais causas deste problema é o uso abusivo e inadequado de antibiótico, favorecido pela produção e comercialização dos mesmos em embalagens com um número de doses em desacordo com o necessário para o tratamento padrão (Opas, 1999; Fauci, 2001; Norrby, 2005; Marques, 2006). A falta de integração da indústria com os estudos de vigilância epidemiológica da resistência bacteriana dificulta o desenvolvimento de fármacos compatíveis com os padrões de sensibilidade/resistência de patógenos importantes (Opas, 2001; Norrby, 2005). As alterações fenotípicas das células bacterianas, o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (Veiga, 1984; Donlan e Costerton, 2002; Rice e Bonomo, 2005; Dzidic, Suskovic e Kos, 2007; Todar, 2012) e a capacidade de sobrevivência dos microrganismos em superfícies de dispositivos médicos favorecida pela presença de fluídos biológicos são também potenciais causas da resistência aos antibióticos. O tempo de sobrevivência bacteriana em superfícies pode ser aumentado na presença de fluídos biológicos como sangue e urina, pois a matéria orgânica favorece a adesão bacteriana sobre superfícies inertes, assim como a quantidade, o tipo de células em contacto com o dispositivo e as características físico-químicas das células e do próprio dispositivo (Hirai, 1991; Mizunoe *et al.*, 2000; Donlan, 2001; Boulange - Petermann *et al.*, 2004; Donskey, 2004).

As bactérias resistentes aos mais modernos antimicrobianos são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Vibrio cholerae* e *Staphylococcus aureus* (Kramer *et al.*, 2006).

1.4 Estratégias no Combate à Resistência Bacteriana

A prevalência global de estirpes de *S. aureus* resistentes a antibióticos está a aumentar de ano para ano e, portanto, a infeção causada por estirpes desta espécie representa um grave problema epidemiológico (Costa, 2009). De forma a combater esta resistência, soluções alternativas aos antibióticos têm sido propostas, nomeadamente a modificação química das superfícies dos dispositivos médicos implantados, através de revestimentos contendo propriedades antissépticas (Fux *et al.*, 2005; Kumon *et al.*, 2001; Von Eiff *et al.*, 2005), como a clorexidina e sulfadiazina

de prata, e com minociclina e rifampicina (Veenstra *et al.*, 2002). Outra abordagem consiste na alteração da rugosidade das superfícies de cateteres como, por exemplo, a produção de superfícies muito lisas; o acoplamento subsequente de agentes antimicrobianos pode também ser uma forma para a prevenção da adesão bacteriana (Poortinga *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2005; Camargo *et al.*, 2009). No entanto, muitos destes estudos foram realizados revestindo apenas a superfície externa do cateter e nenhuma proteção foi conferida contra a invasão microbiana da superfície interna. Por conseguinte, estes cateteres demonstraram ser particularmente eficazes na redução do risco de contaminação a curto prazo (Veenstra *et al.*, 2002), não conseguindo reduzir o risco de situações de cateterização a longo prazo (Logghe *et al.*, 1997).

Apesar do desenvolvimento de novas estratégias, tem sido extremamente difícil conseguir um material completamente “anti-adesão” principalmente devido à superfície do material ser rapidamente coberta por plasma e por proteínas da matriz de microrganismos em biofilme (Arciola *et al.*, 2005). Assim, apesar dos grandes esforços em melhorias nas técnicas de implantação, nos materiais e terapias antimicrobianas, as infeções associadas a microrganismos resistentes a antibióticos são ainda difíceis de erradicar.

A nanotecnologia tem surgido como uma das estratégias mais promissoras para o controlo de bactérias planctónicas e em biofilme (Sousa *et al.*, 2011). Investigações nanotecnológicas utilizando a hipertermia magnética (HM) no combate à resistência bacteriana estão a ser levadas a cabo, permitindo o direccionamento de NPs magnéticas, nomeadamente SPIONs, através de um campo magnético externo com o objetivo de causar a lise das células bacterianas no estado planctónico e em biofilme (Ivan Sondi e Branka Salopek-Sondi, 2004; Park *et al.*, 2011; Subbiahdoss *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012). As SPIONs possuem diâmetros que variam dos 5 até aos 100 nm, constituindo uma das mais importantes classes de nanomateriais magnéticos (Sousa *et al.*, 2011). Estas NPs estão a ser utilizadas cada vez mais em aplicações biomédicas, como agentes de contraste para ressonância magnética (IRM), libertação controlada de drogas (Jain *et al.*, 2008), marcação celular, bioseparação, biosensores, diagnóstico (Mohammad *et al.*, 2010) e terapias médicas como HM aplicada na terapia do cancro (Jordan *et al.*, 2001; Horák, 2005; Gupta e Gupta, 2005; Neuberger *et al.*, 2005; Mohammad *et al.*, 2010).

1.5 Estudos de Interação entre SPIONs e Células Bacterianas

As SPIONs possuem propriedades importantes para permitir a interação com as células bacterianas, nomeadamente o revestimento polimérico que torna a NP estável, e o seu tamanho reduzido que permite uma interessante investigação biomédica (Ravishankar *et al.*, 2011). Um estudo realizado em 2009 por Taylor e Webster demonstrou que a utilização de SPIONs, sozinhas ou em conjunto com outros agentes terapêuticos, evitou a formação de biofilmes em próteses ortopédicas através da ligação à membrana celular ou proteínas da membrana celular através de ligações eletrostáticas, diminuindo a infeção instalada na prótese.

Num estudo realizado em 2010 por Park e outros investigadores, foi desenvolvida uma nova estratégia com objetivo de inativar biofilme de *P. aeruginosa* utilizando o efeito térmico através de SPIONs, uma corrente alternada, e um campo magnético, observando-se a desintegração da membrana celular bacteriana.

Recentemente, em 2012, Subbiahdoss e seus colaboradores avaliaram a hipótese de SPIONs poderem ser eficazes no tratamento de infeções causadas por bactérias associadas a biomateriais. As SPIONs podem ser direcionadas para o local da infeção utilizando um campo magnético externo, permitindo uma penetração profunda dentro do biofilme, sendo eficazes em estirpes resistentes a antibióticos que não conseguem atravessar além da superfície do biofilme, como se pode verificar na **Figura 1.4**.

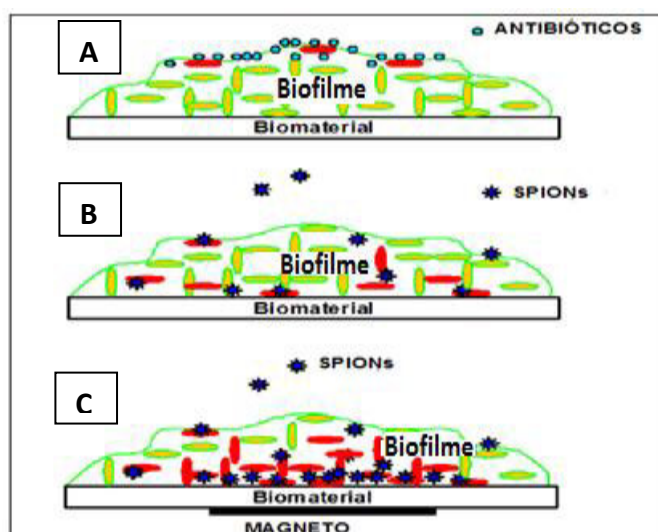


Figura 1.4 – Efeito antimicrobiano das SPIONs no interior de um biofilme na superfície de um biomaterial. Na imagem é possível observar a penetração do antibiótico na camada superficial do biofilme (A). A presença de SPIONs revela o aumento de permeabilidade no biofilme (B). O contacto com um campo magnético externo pode

facilitar a penetração profunda de SPIONs no biofilme, melhorando a eficácia antibacteriana (C). A cor vermelha representa bactérias mortas e a cor verde representa bactérias vivas. Figura adaptada de Subbiahdoss *et al.*, 2012.

Estudos têm sido realizados com SPIONs no combate à resistência bacteriana e para diminuir as infecções causadas pelas bactérias, mas não se têm aprofundado estudos sobre o mecanismo de interação das SPIONs com as células bacterianas.

Este projeto foca a investigação para a análise de SPIONs a interagir com as células bacterianas em solução. Existem vários métodos para caracterizar células e SPIONs em solução e, neste estudo, é efetuada a caracterização de células de *S. aureus* e de SPIONs de acordo com a metodologia descrita nas seguintes subsecções.

1.6 Metodologias de Análise em Solução

As NPs e as células bacterianas são comumente analisadas em solução. Para analisar as interações entre *S. aureus* e SPIONs em solução, é necessário preparar amostras com células bacterianas e SPIONs e efetuar a caracterização com diferentes métodos que sejam compatíveis com amostras em solução.

Neste projeto, o método utilizado para a caracterização das SPIONs em termos de estabilidade coloidal foi a centrifugação. Para a caracterização da estabilidade em solução e quantificação celular de *S. aureus* recorreu-se à centrifugação, e aos métodos de contagem de unidades formadoras de colónias e leitura da densidade ótica. Nas subsecções abaixo é apresentada uma breve introdução a estes métodos, que são também descritos em mais detalhe nos Capítulos seguintes.

1.6.1 Densidade Ótica

Para avaliar o crescimento de uma cultura microbiana normalmente recorre-se à leitura da densidade ótica (DO) ou absorbância. É um método que permite a monitorização do crescimento bacteriano através da turbidez. Existe, dentro de certos limites, uma relação linear entre a absorbância ou DO da cultura e o número total de células por mililitro de suspensão, ou seja a concentração celular. Contudo, para suspensões celulares muito densas é frequentemente necessário diluir as culturas de modo a que todos os valores de DO medidos estejam incluídos na parte linear da curva DO *versus* concentração celular. A quantificação celular por este método é simples,

rápida, mas uma forma indireta de estimar a concentração celular, não permitindo a distinção de células viáveis das não viáveis (Ivan Sondi e Branka Salopek-Sondi, 2004).

1.6.2 Unidades Formadoras de Colónias

Em microbiologia, bactérias e fungos presentes numa amostra são quantificados em termos de Unidades Formadoras de Colónias por volume (UFC/mL), correspondendo a uma estimativa do número de bactérias ou de fungos viáveis numa solução (Ivan Sondi e Branka Salopek-Sondi, 2004). De acordo com esta técnica, considera-se que, através de uma amostra diluída e plaqueada num meio de cultura sólido, se originem colónias bacterianas. Porém, as colónias crescidas em placas podem surgir a partir de uma única célula ou 1000 células (Robert e Dotterrer, 1916).

Para a contagem ser significativa deve conter um número de UFCs entre 30 e 300 por diluição. Assim, para assegurar que a amostra irá produzir entre 30-300 UFCs são necessárias diluições da amostra e o plaqueamento dessas diluições. As UFCs são contadas a partir de uma placa e, em seguida, o UFC/mL é deduzida matematicamente, tendo em consideração o volume adicionado e o seu fator de diluição (Hill, 1908; Robert e Dotterrer, 1916).

1.6.3 Processo de Centrifugação

Nas subseções seguintes é apresentada uma breve explicação sobre o processo de centrifugação utilizado para as células bacterianas e para as NPs.

1.6.3.1 Centrifugação de Células Bacterianas

A centrifugação é uma prática muito comum em laboratórios para a compactação de bactérias planctónicas. A centrifugação envolve a compactação de bactérias através da formação de um sedimento (*pellet*), causando colisões, umas contra as outras, que resultam em forças de cisalhamento na superfície das células bacterianas. Durante a centrifugação, diferentes valores de força efetiva (variando aproximadamente de 1000 a 12000 g) são comumente usados mas, na literatura não é geralmente mencionada a razão para a escolha de um valor em particular (Allan e Pearce, 1979; Romaní *et al.*, 2008; Van der Mei *et al.*, 2008). No entanto, também de

acordo com a literatura, os investigadores selecionam elevadas velocidades de centrifugação com o objetivo de recolher o maior número de células bacterianas, assumindo que não causam qualquer dano celular ou morte celular bacteriana (Vats *et al.*, 2000; Deupree e Schoenfisch, 2008; Romaní *et al.*, 2008).

1.6.3.2 Centrifugação de Nanopartículas

Relativamente aos nanomateriais, a centrifugação tem sido usada para permitir a separação eficiente baseada na forma e nos diferentes tamanhos das NPs numa mistura coloidal (Svedberg e Pederson, 1940; Russel *et al.*, 1989). A compreensão dos parâmetros físicos que impulsionam a separação é um passo necessário para o uso generalizado da centrifugação voltado para o estudo de técnicas de separação de NPs (Vivek Sharma *et al.*, 2009).

1.7 Análise de Amostras Biológicas por Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) tem sido utilizada comumente para estudar as características de microrganismos (Cleare e Casadevall, 1999; Nosanchuk *et al.*, 1999; Ivan Sondi e Branka Salopek-Sondi, 2004). Materiais secos, tais como osso, penas, insetos secos ou cascas podem ser examinados, mas as células vivas, tecidos e organismos inteiros de corpo mole normalmente requerem fixação química para estabilizar e conservar a sua estrutura. A fixação é geralmente realizada por incubação numa solução como o glutaraldeído, por vezes em combinação com formaldeído (Jeffree e Read, 1991; Karnovsky, 1965; Kiernan *et al.*, 2000) e outros fixadores, (Russell e Daghlán, 1985; Jeffree e Read, 1991). A amostra biológica é posteriormente desidratada em soluções com concentrações crescentes de etanol. Por fim, é necessário secar muito bem a amostra para remover qualquer material volátil, o que poderia interferir com o desempenho do microscópio eletrónico (Chang e Rittmann, 1985; Josiane *et al.*, 2005). Uma amostra biológica analisada por SEM tem que necessariamente estar completamente seca, uma vez que a câmara de amostra é constituída por elevado vácuo.

A preparação da amostra por filtração da solução num filtro parece ser um suporte apropriado (Santos, 2001). Porém, a análise da amostra filtrada é diretamente influenciada pelo filtro escolhido. A **Figura 1.5** mostra o aspeto de filtros de celulose, cloreto de polivinilo (PVC) e policarbonato obtido por microscopia eletrónica.

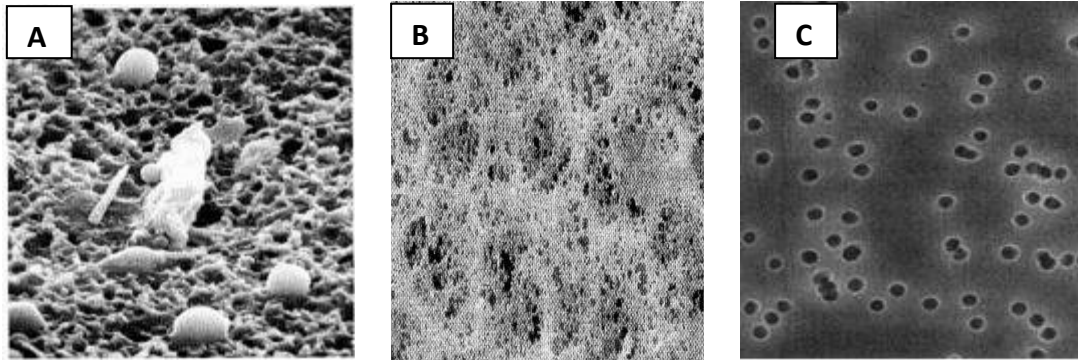


Figura 1.5 – Aspeto de diferentes filtros observados por microscopia eletrónica. Aspeto dos filtros de celulose (A), PVC (B) e policarbonato (C). Figura adaptada de Santos, 2001.

Para a análise da mistura de células bacterianas e NPs por microscopia eletrónica, é necessário que o filtro seja plano e liso para permitir uma boa visualização dos diferentes componentes da amostra. O filtro de policarbonato apresenta as características mencionadas comparativamente com os filtros de celulose e PVC. O tamanho do poro do filtro entre 0,20 μm a 0,30 μm é considerado importante para impedir a perda de células durante o processo de filtração uma vez que, o tamanho das células de *S. aureus* está entre 0,50 μm a 1,50 μm (Kloos e Bannerman, 1994; Ferreira e Sousa, 2000; Harris *et al.*, 2002).

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE COLOIDAL DE NANOPARTÍCULAS EM SOLUÇÃO

2.1 Introdução

A compreensão do comportamento físico-químico de NPs é objeto de inúmeras pesquisas. Este comportamento depende em grande parte do método de síntese utilizado (Schaffazick *et al.*, 2003). No entanto, independentemente do método de síntese e, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das NPs em solução resultando na formação de precipitados e indicando problemas relacionados com a estabilidade coloidal (Guterres *et al.*, 1985; Saez, 2000). Uma solução/suspensão coloidal é estável se não forem observadas evidências de instabilidade coloidal (aglomeração, agregação, sedimentação). O comportamento de NPs em suspensão podem variar de acordo com as propriedades das soluções, nomeadamente com o pH das soluções, a concentração de sais em solução e com as propriedades das NPs, tais como o revestimento da superfície das NPs, entre outros (Guterres *et al.*, 1985; Paul *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2011). Uma forma de tentar garantir a estabilidade de NPs em solução consiste precisamente em efetuar o revestimento e/ou modificação da superfície das mesmas com uma camada de polímero sintético ou proteínas (Zhang *et al.*, 1998; Schrick *et al.*, 2004; Saleh *et al.*, 2005; He *et al.*, 2007; Sirk *et al.*, 2009; Cirtiu *et al.*, 2011). Estas modificações podem resultar em dois tipos de estabilização de NPs em solução: a estabilização estérica e a estabilização eletrostática (Saleh *et al.*, 2005) – **Figura 2.1.** Um exemplo de estabilização estérica de NPs são as *polymer brushes* (Milner, 1991; Roucoux *et al.*, 2002). Uma *brush* é constituída por cadeias (moléculas) poliméricas individuais ligadas à superfície da NP por uma extremidade. Este arranjo, em escova, das cadeias poliméricas favorece energeticamente as interações com um solvente e, quando duas NPs se aproximam o revestimento da *polymer brush* cria uma força repulsiva (repulsão estérica) evitando a interpenetração das duas *brushes* (Milner, 1991; Roucoux *et al.*, 2002). A estabilização eletrostática de NPs refere-se a uma estabilização através do revestimento da superfície da NP com carga (positiva ou negativa). Essa carga impede que as NPs se aproximem devido à repulsão eletrostática e, deste modo, que o processo de agregação se inicie (Schaffazick *et al.*, 2003).

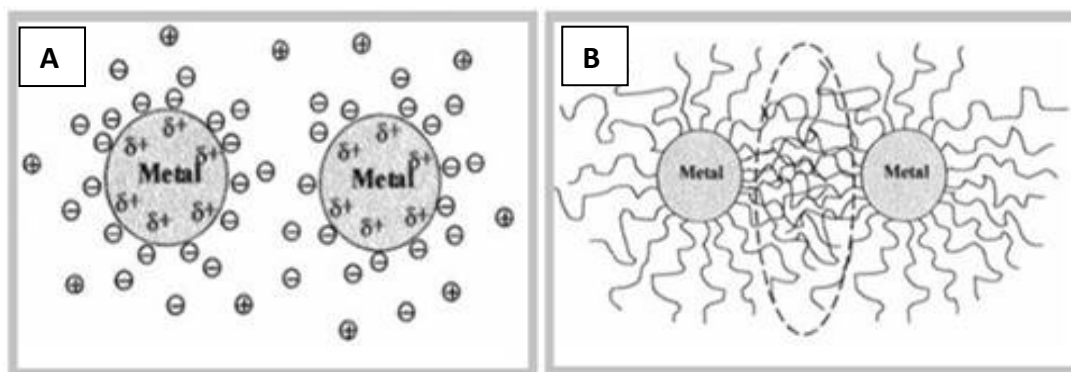


Figura 2.1 – Exemplos de mecanismos de estabilização de NPs metálicas. Estabilização eletrostática (A) e Estabilização estérica (B). Figura adaptada de Roucoux *et al.*, 2002.

Os surfactantes constituem um caso particular de estabilização eletrostática. Estes podem ser misturados em soluções de NPs (com ou sem revestimento) e geralmente ficam adsorvidos à sua superfície permitindo, assim, uma alteração drástica das propriedades das NPs (Nam *et al.*, 2012). Um surfactante iônico comumente utilizado em suspensões coloidais de NPs magnéticas, e que também é utilizado para estabilizar soluções de NPs neste projeto, é o hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH), permitindo a solubilidade em água de NPs sintetizadas como hidrofóbicas (Spanhel, 1987; Henglein, 1989; Salgueiriço-Maceira *et al.*, 2004).

No presente capítulo é determinada a estabilidade coloidal de cinco tipos de SPIONs: Três variantes de SPIONs revestidas pelo polímero hidrofílico poli (ácido acrílico) (PAA) e duas variantes de SPIONs revestidas pelo polímero hidrofóbico ácido oleico (AO).

A estabilidade coloidal das SPIONs foi determinada em diferentes soluções: cloreto de sódio (NaCl 0,9 % e NaCl 0,45 %) e tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate buffered saline*) (PBS 0,01 M), que são as soluções salinas comumente utilizadas em ensaios de cultura bacteriana (Parfentjev e Catelli, 1963), e água destilada.

Um dos métodos utilizados neste projeto para a determinação da estabilidade coloidal das SPIONs em solução foi a precipitação estática. Este método consiste na mistura de SPIONs com as diferentes soluções, por exemplo, SPIONs em água destilada, a fim de observar a eventual precipitação das SPIONs ao longo do tempo de armazenamento. A precipitação estática fornece uma seleção preliminar das melhores soluções a serem utilizadas com as SPIONs. Porém, testes mais rigorosos e eficientes

são necessários para acelerar o processo de seleção das soluções nas quais as SPIONs são mais estáveis. O processo de centrifugação das SPIONs nas diferentes soluções é possível de ser um método vantajoso e sensível para determinar os limites da estabilidade das SPIONs. Como já mencionado no Capítulo 1, este método é equacionado como uma possibilidade para permitir a separação das células bacterianas das SPIONs livres, sendo então bastante útil a sua aplicação para determinar a estabilidade coloidal das SPIONs e as condições apropriadas para prosseguir o estudo com as células de *S. aureus*.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Nanopartículas Superparamagnéticas de Óxido de Ferro

Neste projeto foram utilizadas cinco SPIONs diferentes: três variantes de SPIONs revestidas pelo polímero hidrófilico poli (ácido acrílico) (PAA) e duas variantes de SPIONs revestidas pelo polímero hidrofóbico ácido oleico (AO). As SPIONs foram gentilmente cedidas pelo Dr. Yury Kolen'ko do Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (INL).

As três variantes de SPIONs PAA foram sintetizadas por dois métodos diferentes: duas variantes de SPIONs PAA foram sintetizadas pelo método de co-precipitação – PAA-CP-1 e PAA-CP-2, e uma variante de SPIONs PAA pelo método hidrotermal – SPIONs PAA-HT. As SPIONs PAA-CP-1 e PAA-CP-2 diferem na concentração dos sais (FeCl_2 e FeCl_3) utilizados durante a síntese: a síntese de PAA-CP-2 foi realizada com o dobro da concentração de reagente usada para a síntese de PAA-CP-1. A síntese das diferentes SPIONs foi efetuada de forma semelhante à síntese de SPIONs descrita no trabalho de Salgueiriço-Maceira *et al* (2004).

Relativamente às duas variantes de SPIONs AO, estas foram sintetizadas como hidrofóbicas pelo método hidrotermal mas, em seguida, tratadas com diferentes quantidades de surfactante TMAOH (TMAOH-1 e TMAOH-2) para as tornar solúveis em água. A concentração de TMAOH-1 é menor que a concentração de TMAOH-2.

Na **Tabela 2.1** estão esquematizadas todas as SPIONs utilizadas neste projeto.

Tabela 2.1 – SPIONs utilizadas durante o projeto.

As SPIONs utilizadas neste projeto foram três variantes de SPIONs revestidas pelo polímero hidrófilico poli (ácido acrílico) (PAA) e duas variantes de SPIONs revestidas pelo polímero hidrofóbico ácido oleico (AO).

SPIONs revestidas pelo polímero hidrófilico Poli (Ácido Acrílico)		SPIONs revestidas pelo polímero hidrofóbico Ácido Oleico		
Método de Síntese				
Co-precipitação		Hidrotermal		
PAA-CP-1	PAA-CP-2	PAA-HT	AO-TMAOH-1	AO-TMAOH-2

2.2.2 Preparação de Soluções

Para determinar a estabilidade coloidal das SPIONs foram utilizadas as seguintes soluções: NaCl 0,9 %, NaCl 0,45 %, PBS 0,01 M e água destilada.

O PBS foi preparado de acordo com a seguinte composição (g/L): 8 g de NaCl (Scharlau); 0,2 g de KCl (Pronalab); 0,2 g de KH_2PO_4 (Pronalab) e 1,15 g de NaH_2PO_4 (Pronalab). Após a preparação das soluções, o pH foi ajustado (pH=7,2), com a ajuda de ácido clorídrico (HCl) a 20 % e da base hidróxido de sódio (NaOH) a 37 %. Seguidamente, as soluções salinas e a água destilada foram esterilizadas a 121 °C por autoclavagem (Hiclave) durante 20 min e armazenadas à temperatura ambiente.

2.2.3 Determinação da Estabilidade Coloidal das SPIONs

Antes de cada ensaio com SPIONs, as soluções *stock* das SPIONs foram submetidas a um banho de ultra-sons (Sonicor) durante 10 min de forma destruir os agregados que se possam ter formado durante o tempo de armazenamento.

A estabilidade coloidal das SPIONs foi determinada nas diferentes soluções (descritas na subsecção em 2.2.2) por diferentes métodos: (1) precipitação estática e (2) precipitação por centrifugação.

1) Precipitação Estática

Para a determinação da estabilidade coloidal das PAA-CP-1 por precipitação estática, a solução *stock* das SPIONs foi diluída em diferentes *eppendorfs*: 2 µL das PAA-CP-1 da solução *stock* e perfazendo um volume final de 200 µL de NaCl 0,9 %, NaCl 0,45 %, PBS 0,01 M ou água destilada. De seguida, os *eppendorfs* foram colocados *overnight* à temperatura ambiente.

Como explicado na secção dos resultados, apenas a estabilidade coloidal das PAA-CP-1 foi determinada por precipitação estática. A estabilidade coloidal das SPIONs cedidas posteriormente foi determinada por precipitação por centrifugação.

2) Precipitação Por Centrifugação

A estabilidade coloidal das cinco SPIONs foi determinada pelo método de precipitação por centrifugação. Para tal, as soluções *stock* das SPIONs foram diluídas em diferentes *Falcons* com um volume final de 5000 µL: 5 µL de solução *stock* de SPIONs em 4995 µL de solução (NaCl 0,9 %, NaCl 0,45 %, PBS 0,01 M ou água destilada). Foram preparadas diferentes combinações em separado para serem testadas em velocidades de centrifugação crescentes durante 5 min – 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 e 8000 rpm – até ser atingido o limite de estabilidade coloidal para cada condição testada.

2.3 Resultados e Discussão

O trabalho desenvolvido neste Capítulo teve como objetivo principal avaliar a estabilidade coloidal de diferentes SPIONs em quatro diferentes soluções: NaCl 0,9 %, NaCl 0,45 %, PBS 0,01 M e água destilada, pelo método precipitação estática e pelo método de precipitação por centrifugação.

2.3.1 Precipitação Estática das SPIONs

Na **Figura 2.2** observa-se o efeito das diferentes soluções na estabilidade das PAA-CP-1, pelo método da precipitação estática. Para cada combinação foram realizadas experiências em triplicado e o mesmo resultado foi obtido.

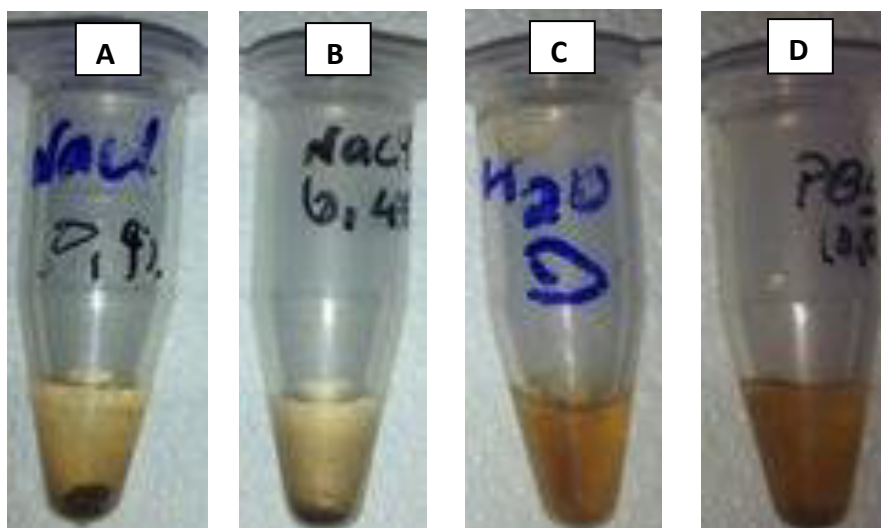


Figura 2.2 – Precipitação estática das PAA-CP-1 em diferentes soluções.

Na imagem observa-se a precipitação das SPIONs PAA-CP-1 em NaCl 0,9 % (A); NaCl 0,45 % (B) e PBS 0,01 M (D). Na imagem observa-se a ausência de precipitado de PAA-CP-1 em água destilada (C).

Numa primeira análise dos resultados obtidos para a estabilidade coloidal das PAA-CP-1 (**Figura 2.2**) é possível, através da observação da cor das diferentes soluções, perceber que a estabilidade coloidal das PAA-CP-1 parece ser afetada na presença de sais em solução. Isto porque, como se pode ver na **Figura 2.2C**, a estabilidade coloidal das PAA-CP-1 em água destilada não parece ter sido afetada, mantendo-se a solução estável (cor homogênea) após precipitação estática *overnight*. Em contrapartida, a solução de NaCl 0,9 % demonstra ter um efeito determinante na estabilidade coloidal das PAA-CP-1 pela formação de um grande precipitado (**Figura 2.2A**). A formação de precipitado é ainda bem visível na solução de NaCl 0,45 % (**Figura 2.2B**). O PBS 0,01 M foi a solução salina onde a formação de precipitado foi menor **Figura 2.2D**.

A precipitação das PAA-CP-1 na presença de sais pode ser resultado do *screening* de repulsão eletrostática entre NPs, o que reduz a estabilidade coloidal. Porém, os resultados obtidos por este método não podem ser considerados totalmente conclusivos, porque a informação direta só é obtida sobre o limite de estabilidade das PAA-CP-1 que formam um precipitado. Para se obter resultados mais consistentes seriam necessárias mais horas e/ou dias para verificar a possível existência de um

pequeno número de SPIONs instáveis em solução que pudessem acabar por precipitar e permitir concluir se a estabilidade coloidal das PAA-CP-1 é afetada por longo tempo de armazenamento em água destilada.

Apenas a estabilidade coloidal das PAA-CP-1 foi determinada por precipitação estática uma vez que foram as primeiras SPIONs a serem cedidas para o presente estudo. Tendo em conta a gestão de tempo e a falta de resultado mais conclusivos, a estabilidade coloidal das SPIONs cedidas posteriormente foi determinada por centrifugação.

2.3.2 Precipitação de SPIONs por Centrifugação

Na **Tabela 2.2** apresentam-se os resultados da estabilidade coloidal pelo método de centrifugação para os cinco tipos de SPIONs em NaCl 0,9 %, NaCl 0,45 %, PBS 0,01 M e em água destilada. Para cada combinação de NPs e solução foram preparadas diferentes amostras e cada amostra foi centrifugada a uma velocidade diferente até atingir o limite de estabilidade, ou seja, até que a precipitação das SPIONs fosse claramente observada, o que significa que o limite de estabilidade foi atingido. Para cada combinação foram realizadas experiências em triplicado, tendo-se observado o mesmo resultado.

Tabela 2.2 – Precipitação das SPIONs (PAA e AO) nas quatro soluções, a diferentes velocidades de centrifugação. Os retângulos pretos mostram que para todas as SPIONs em nenhuma solução se observa um único limite de estabilidade. Os retângulos cinza mostram que não se observa um único limite de estabilidade em todas as soluções para qualquer uma variante das SPIONs. A estabilidade coloidal das SPIONs foi determinada nas velocidades (rpm) de 1000 a 8000 rpm. Na Tabela encontram-se apresentadas apenas as velocidades onde ocorreu precipitação.

	PAA-CP-1	PAA-CP-2	PAA-HT	AO-TMAOH-1	AO-TMAOH-2
Solução	Velocidades (rpm) em que a precipitação das SPIONs é observável				
NaCl 0,9%	1000	2000	5500	1000	1000
NaCl 0,45%	1000	3000	4000	1000	1000
PBS 0,01 M	1000	3500	3000	1000	1000
Água destilada	3500	3500	3000	3500	6500

Observando os resultados da **Tabela 2.2** é possível afirmar que globalmente a estabilidade coloidal das SPIONs é influenciada pelas suas propriedades físico-químicas. Isto porque não se observa o mesmo limite de estabilidade para todas as SPIONs em nenhuma solução, ou seja, as diferentes concentrações de sal presentes nas soluções têm efeito na estabilidade coloidal das SPIONs. No entanto, também não é observado o mesmo limite de estabilidade em todas as soluções para qualquer uma variante das SPIONs. Esta variabilidade confirma que foram selecionadas propriedades relevantes de NPs e de soluções para a determinação da estabilidade coloidal.

Analisando especificamente a estabilidade coloidal das SPIONs revestidas com PAA, na presença de soluções salinas, é possível observar um baixo limite de estabilidade para as PAA-CP-1. Em contrapartida, em água destilada o resultado é ligeiramente melhor, sugerindo que esta solução permite um comportamento especial das PAA-CP-1.

Relativamente ao comportamento das PAA-CP-2 na presença de soluções salinas e água destilada, não se verificam grandes diferenças, ou seja, a estabilidade coloidal das PAA-CP-2 não é significativamente afetada pela presença, tipologia e concentração salina em solução.

A estabilidade coloidal das PAA-HT é semelhante na presença do PBS 0,01 M e água destilada, e o mesmo é verificado para a estabilidade coloidal das PAA-CP-2. No entanto, para as PAA-HT, os resultados do limite de estabilidade são muito diferentes na presença das soluções de NaCl 0,9 % e NaCl 0,45 %. Uma maior estabilidade coloidal é observada nas PAA-HT na presença de concentração de sais como NaCl 0,9 % e NaCl 0,45 %, quando comparadas com as PAA-CP, na presença destas concentrações salinas. Apesar de não ser possível afirmar que, neste caso específico, as diferentes características do revestimento (PAA e AO) das SPIONs e o método de síntese (hidrotermal e co-precipitação) são o fator determinante deste resultado, sabe-se que, o revestimento da superfície das NPs é fundamental para a sua estabilização (Martins, 2011). Segundo Milkhaik *et al.* (2008), o método de síntese hidrotermal resulta num melhor controlo do tamanho e da morfologia das NPs, assim como em níveis de agregação significativamente reduzidos.

Relativamente à estabilidade coloidal de AO-TMAOH-1 e AO-TMAOH-2, é possível observar, pelos dados da **Tabela 2.2**, que os resultados são semelhantes na presença das diferentes soluções utilizadas. As soluções salinas parecem ter um efeito dominante na estabilidade coloidal das AO-TMAOH, mas a concentração de sais não parece ser determinante, dado que o limite de estabilidade não é alterado na presença de diferentes concentrações de sais. Analisando especificamente os limites de estabilidade das AO-TMAOH na presença de água destilada, os resultados mostram uma diferença entre as AO-TMAOH-1 e as AO-TMAOH-2. Verifica-se uma estabilidade coloidal até 3000 rpm nas AO-TMAOH-1 e até 6000 rpm nas AO-TMAOH-2. A possível justificação para este resultado pode ser devido à concentração mais elevada de surfactante TMAOH adicionada às AO-TMAOH-2 em relação à adicionada às AO-TMAOH-1 evitando, desta forma, a agregação (Saez *et al.*, 2000). Porém, em nenhum outro tipo de SPION se verifica um limite de estabilidade tão elevado como na AO-TMAOH-2 (**Tabela 2.2**).

Em suma, para cada solução com as cinco SPIONs verificou-se uma precipitação abrupta, embora a diferentes velocidades, e foram observadas evidências de dois mecanismos de estabilização. Teoricamente, os dois tipos de SPIONs AO-TMAOH têm um padrão muito semelhante de estabilidade coloidal. Isto significa que a estabilidade

é baixa em qualquer sal e é mais elevada em água destilada. Este padrão é consistente com a estabilização predominantemente eletrostática, ou seja, a estabilização é enfraquecida por *screening* na presença de qualquer sal (Schaffazick *et al.*, 2003). É importante salientar que as PAA-CP-1 têm o mesmo padrão de estabilidade das AO-TMAOH, indicando que provavelmente têm o mesmo mecanismo de estabilização.

Relativamente às SPIONs PAA-CP-2 e PAA-HT, estas SPIONs têm características da estabilização predominantemente estérica, ou seja, a estabilidade é fortemente afetada não só pela concentração, mas também pelo tipo de sal. No entanto, o limite de estabilidade coloidal das PAA-CP-2 e PAA-HT não é elevado em água destilada. Este padrão é consistente com a estabilização estérica, porque a estabilização estérica depende da hidratação da *polymer brush*, que é afetada pelo tipo de sal e nem sempre é maximizada em água pura (Milner, 1991; Roucoux *et al.*, 2002).

2.4 Conclusão

O presente Capítulo focou-se na determinação da estabilidade coloidal de diferentes SPIONs em diferentes soluções. Em resumo, as principais conclusões derivadas do trabalho experimental realizado são as seguintes:

- 1) A precipitação estática permite a seleção das soluções para ensaios experimentais com as NPs que precipitam de forma significativa durante o ensaio experimental, em particular para as NPs que precipitam imediatamente. Para soluções de SPIONs com uma maior estabilidade coloidal é difícil o uso deste método, Em soluções estáticas, a sedimentação pode levar vários dias, assim decidir se é uma solução estável depende do método utilizado para detetar sinais de instabilidade.
- 2) O processo de centrifugação é considerado um método eficiente para avaliar e comparar a estabilidade coloidal das SPIONs.
- 3) As propriedades das diferentes soluções e das diferentes SPIONs determinam a estabilidade coloidal.

- 4) Para cada solução com as cinco SPIONs verificou-se uma precipitação abrupta embora a diferentes velocidades.
- 5) Para as SPIONs AO-TMAOH-1, AO-TMAOH-2 e PAA-CP-1 observou-se evidências da estabilização predominantemente eletrostática.
- 6) Para as SPIONs PAA-CP-2 e PAA-HT observou-se evidências da estabilização predominantemente estérica.
- 7) O limite de estabilidade foi observado a 6000 rpm para as SPIONs AO-TMAOH-2 em água destilada.

Encontrado o limite superior de estabilidade coloidal para AO-TMAOH-2 em água destilada, é proposto e considerado importante testar a mistura das AO-TMAOH-2 com células de *S. aureus* em água destilada e posteriormente a separação de AO-TMAOH-2 livres das células bacterianas. Esta separação é baseada na diferente estabilidade coloidal pelo método de centrifugação.

Em alternativa, se a água destilada não funcionar na separação, é possível observar novamente os resultados apresentados na **Tabela 2.2** e propor novas condições a serem testadas/estudadas.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM SOLUÇÃO

3.1 Introdução

Analisar a interação de NPs com células bacterianas constitui um potencial interesse deste projeto. Esta análise só é possível se, numa primeira fase, as NPs e as células forem caracterizadas separadamente.

Segundo os resultados obtidos no Capítulo 2, a centrifugação demonstrou ser um método eficiente para avaliar a estabilidade coloidal de NPs, nomeadamente SPIONs. Como mencionado anteriormente, as SPIONs que foram sintetizadas como hidrofóbicas pelo método hidrotermal e tratadas com elevada concentração de surfactante TMAOH (AO-TMAOH-2), demonstraram um limite superior de estabilidade coloidal em água destilada, em comparação com as restantes NPs. Dado que a água destilada permite o limite mais elevado de estabilidade coloidal das SPIONs AO-TMAOH-2, é importante compreender o comportamento das células de *S. aureus* em água destilada antes de prosseguir com os estudos da interação de AO-TMAOH-2 e células de *S. aureus*. Contudo, importa salientar que a solução que permitiu um limite superior de estabilidade coloidal das SPIONs pode não corresponder à melhor solução para a viabilidade de *S. aureus*. Segundo a literatura, *S. aureus* é um microrganismo de fácil cultivo e pouco exigente a nível nutritivo. As soluções tradicionalmente utilizadas para o seu crescimento contêm elevada quantidade de sais, sendo considerada uma bactéria “halofílica” (Koch, 1942; Chapman, 1945; Smith, 1958). De forma a avaliar corretamente a viabilidade bacteriana em água destilada é também interessante comparar a viabilidade celular de *S. aureus* em soluções salinas comumente utilizadas para ensaios com *Staphylococcus* (Parfentjev e Catelli, 1963; Liao e Shollenberger, 2003). Assim, nesta fase do projeto é determinada a viabilidade celular de *S. aureus* em água destilada e em diferentes soluções salinas em dois tempos de incubação, 1 h e 24 h, e os resultados de viabilidade de *S. aureus* em água destilada são então comparados com os obtidos com os das soluções salinas. A viabilidade celular é determinada pelo método de contagem de UFCs (Ferreira e Sousa, 2000; Assis, 2007). Se a viabilidade celular em água destilada não for diferente comparativamente com as soluções salinas, e tendo em conta os resultados obtidos no Capítulo 2, a ideia seguinte neste trabalho consiste em determinar a eficiência da centrifugação das células de *S. aureus*. Isto porque, como referido no Capítulo 1, este

método parece ser o mais adequado para permitir a separação das células bacterianas das SPIONs livres em solução. Para tal, a centrifugação terá de ser testada separadamente para as SPIONs e para as células bacterianas, na mesma solução.

Nos resultados apresentados do Capítulo 2, a formação abrupta de um precipitado visível numa velocidade específica de centrifugação foi possível de ser observada para as SPIONs. Para as células bacterianas, a precipitação é provavelmente menos abrupta, impossibilitando a observação visual direta da precipitação com o aumento de rotações. Para monitorizar o crescimento das células bacterianas, normalmente recorre-se a métodos como a leitura da DO da suspensão celular e a contagem de UFCs (Assis, 2007). Num exemplo específico, a medição da calibração típica do crescimento de *S. aureus* reflete-se na relação entre a absorbância e a contagem de UFCs. Por outras palavras, esta relação permite prever o resultado da contagem de UFCs com base na leitura do respetivo valor de absorbância. O gráfico relativo à curva de calibração de *S. aureus* encontra-se apresentado na **Figura 3.1**.

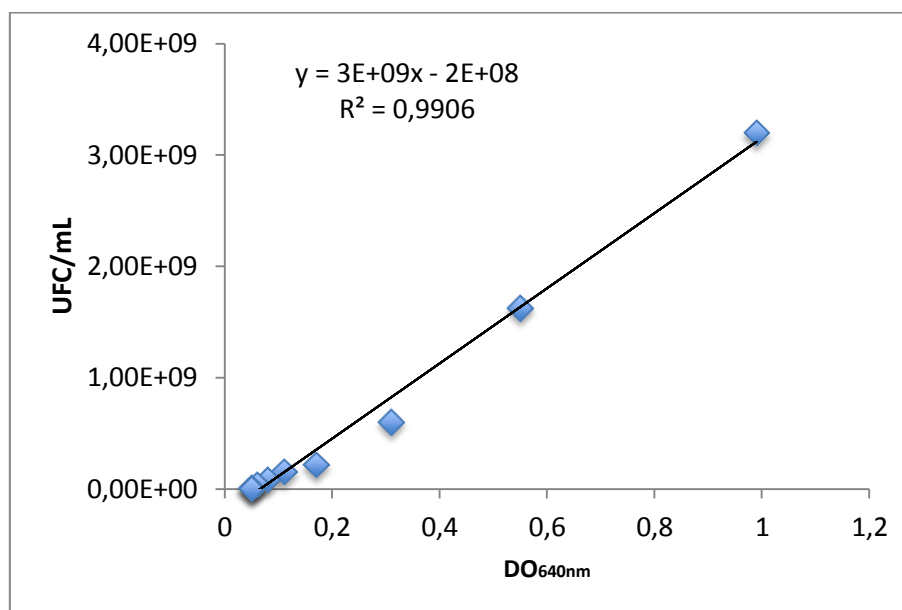


Figura 3.1 – Curva de calibração (DO vs UFC) de *S. aureus* ATCC 25923.

A curva de calibração prevê uma forma de converter a leitura de DO em UFCs. As medições pela contagem de UFCs e leitura de DO são determinadas em função do tempo de crescimento de *S. aureus*.

Figura cedida por cortesia de Susana Lopes (Universidade do Minho).

Como referido no Capítulo 1, um dos objetivos deste trabalho consiste em verificar se o SEM é uma ferramenta fundamental para analisar a interação entre NPs e células bacterianas. Para essa análise ser possível é importante que a amostra a ser

analisada seja composta por células bacterianas individualizadas, isto é, sem conter aglomerados de células, o que implica a utilização de uma concentração celular relativamente baixa.

A curva de calibração apresentada na **Figura 3.1** mostra que para valores de DO elevados, a correlação entre a leitura de DO e a contagem de UFCs é coerente ($R^2=0,9906$) mas, para valores mais baixos – **Figura 3.2** a correlação não é tão coerente porque a inclusão ou exclusão de um único ponto (ponto azul no gráfico da **Figura 3.2**) modifica de forma significativa a correlação inferida.

Dado que a DO de interesse neste projeto se encontra no limite inferior da curva de calibração, é de extrema importância neste Capítulo compreender a correlação entre esses valores utilizando diferentes métodos: contagem de UFCs e leitura da DO da suspensão celular.

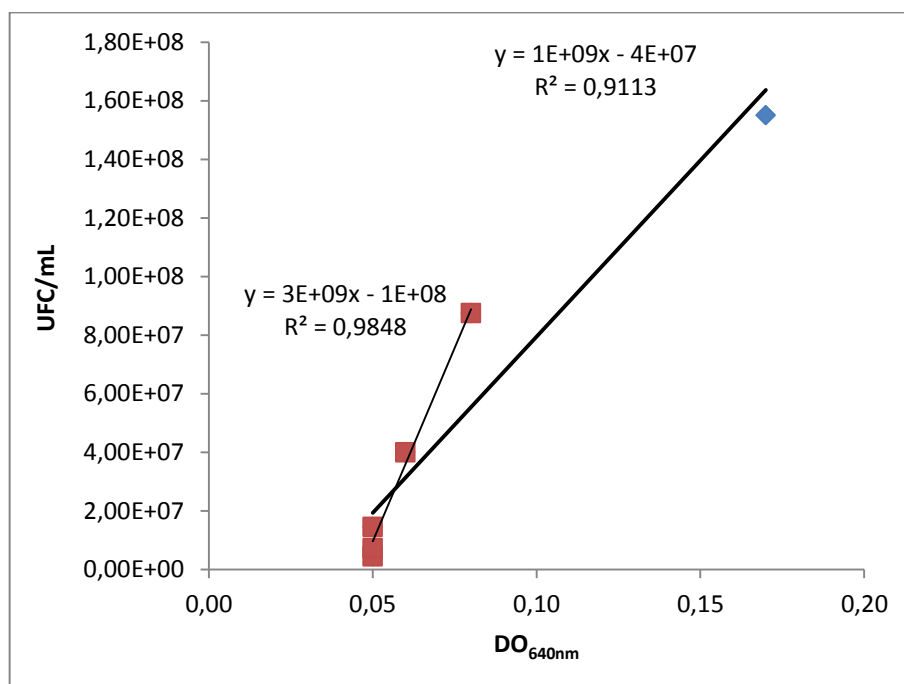


Figura 3.2 – Curvas de calibração (DO vs UFC) de *S. aureus* ATCC 25923 possíveis para valores de concentrações celulares mais baixas.

Figura cedida por cortesia de Susana Lopes (Universidade do Minho).

Sendo o método de leitura de DO uma forma indireta de medir a concentração celular (Assis, 2007) e, dado que se pretendem concentrações celulares baixas, é expectável que os valores de DO correspondentes sejam igualmente baixos. Este facto levanta a questão do grau de incerteza que pode estar associado a um valor nesta gama, uma vez que pode ser um valor muito próximo do limite de sensibilidade dos

aparelhos usados para a medição da leitura de DO. Neste trabalho, pode ser considerado um grau de incerteza aceitável se não for um valor superior a 20 %. Uma abordagem possível para testar este grau de incerteza consiste em usar três amostras que são preparadas para ter uma distinção na concentração celular em 20 % e fazer a interpretação por dois métodos diferentes. Para esta abordagem, três resultados são possíveis de serem obtidos: 1) o valor da incerteza ser muito menor que 0,2, sendo possível uma medição distinta para as soluções, não havendo uma grande sobreposição entre os valores de DO medidas; 2) o valor de incerteza ser maior que 0,2 (como por exemplo 0,5) não sendo possível uma medição distinta para as três amostras preparadas, e os valores sobrepõem-se de forma significativa entre as medições e, 3) a incerteza ser aproximadamente 0,2, verificando-se alguma sobreposição, mas não uma sobreposição completa, obtendo-se resultados diferentes ao medir as diferentes soluções.

A aplicação de um método mais sensível para uma melhor reprodutibilidade das experiências seguintes é necessário, porém é crucial que para as mesmas amostras seja feita a mesma interpretação por dois métodos: pela leitura da DO e pelo método de contagem de UFCs. Por último, comparando os diferentes resultados, é possível determinar a eficiência de centrifugação nas células a diferentes velocidades com resultados fiáveis.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Microrganismo

Staphylococcus aureus ATCC 25923 é o microrganismo de estudo neste projeto. Este microrganismo foi cedido pelo Grupo de Biofilmes, IBB- *Institute for Biotechnology and Bioengineering*, CEB - *Centre of Biological Engineering* – Universidade do Minho.

3.2.2 Meios de Cultura

Neste estudo foram utilizados os seguintes meios para a manutenção e/ou cultura da bactéria *S. aureus*: *Tryptic Soy Agar* (TSA, Liofilchem), *Tryptic Soy Broth* (TSB, Liofilchem) e, adicionalmente utilizado para o procedimento de criopreservação, TSB suplementado com 15 % (v/v) de glicerol (AppliChem).

Para uma identificação seletiva de *S. aureus* foi usado o *Mannitol Salt Agar* (MSA, Liofilchem).

Tryptic Soy Broth

Neste trabalho, o TSB foi preparado com uma concentração de 30 g/L, e esterilizado a 121 °C durante 20 min por autoclavagem (Hiclave). Após a preparação, este meio foi armazenado à temperatura ambiente.

O TSB–glicerol foi preparado a partir de TSB esterilizado suplementado com 15% (v/v) de glicerol (Sigma).

Tryptic Soy Agar

Neste trabalho, o TSA foi preparado com uma concentração de 40 g/L e esterilizado a 121 °C durante 20 min por autoclavagem (Hiclave). Após a preparação do meio, este foi vertido em placas de *Petri*. De seguida as placas foram armazenadas à temperatura ambiente.

Mannitol Salt Agar

O meio MSA foi preparado com uma concentração de 111 g/L, esterilizado a 121 °C durante 20 min por autoclavagem (Hiclave) e armazenado à temperatura ambiente.

3.2.3 Condições de Armazenamento de *Staphyococcus aureus* e Reativação Celular

O armazenamento da estirpe *S. aureus* foi realizado em TSB suplementado com 15 % (p/v) de glicerol (Sigma) a - 80 °C, em tubos criogénicos. Para a reativação celular, a estirpe foi repicada para placas contendo TSA. Estas placas foram colocadas a incubar durante 24 h a 37 °C. As colónias obtidas após o período de incubação foram mantidas a 4 °C em TSA, durante um período de tempo não superior a quinze dias. De notar que todas as operações envolvendo a manipulação microbiana foram realizadas numa câmara de fluxo laminar tipo II (Herasafe).

3.2.3.1 Crescimento de *Staphylococcus aureus*

Inicialmente, as células foram crescidas em placas de TSA durante 24 h a 37 °C. Após esse período, uma colónia isolada foi transferida para 30 mL de TSB. De seguida incubou-se a 37 °C, numa incubadora orbital (N-BIOTEK) durante um período de 18 h e com uma agitação constante de 120 rpm. Posteriormente, a suspensão celular foi lavada por centrifugação, com água destilada, duas vezes, a uma velocidade de 8000 rpm (5430 R, Fisher Scientific) durante 5 min a 4 °C. De seguida, a suspensão celular foi sonicada (Cole Parmer) de acordo com o seguinte ciclo: (20 s + 40 s) 30 % de amplitude + (40 s + 40 s) 40 % de amplitude. Finalmente, a suspensão celular foi ajustada à concentração final pretendida, por leitura da densidade ótica a 640 nm, num espetofotometro de microplacas (Tecan Sunrise).

3.2.4 Preparação de Soluções

As soluções utilizadas na determinação da viabilidade celular de *S. aureus* foram: NaCl 0,9 %, NaCl 0,45 %, PBS 0,01 M e água destilada previamente preparadas como descrito no Capítulo 2 (subsecção 2.2.2).

3.2.5 Avaliação da Viabilidade Celular

Inicialmente, as células bacterianas foram crescidas de acordo como descritas na subsecção 3.2.3.1. De seguida, a suspensão celular foi transferida para quatro *Falcons*, em igual volume, e foi lavada por centrifugação (cada *Falcon* com uma diferente solução: NaCl 0,9 %, NaCl 0,45 %, PBS 0,01 M e água destilada perfazendo um volume de 30 mL), duas vezes, a uma velocidade de 8000 rpm (5430 R, Fisher Scientific) durante 5 min a 4 °C. De seguida, a suspensão celular contida em cada *Falcon* foi sonicada (Cole Parmer) de acordo com o seguinte ciclo: (20 s + 40 s) 30 % de amplitude + (40 s + 40 s) 40 % de amplitude. Posteriormente, a suspensão celular nas diferentes soluções foi ajustada a uma $DO \approx 0,10$ num espetofotometro de microplacas a 640nm (Tecan Sunrise). Após ajustada a DO nas diferentes amostras com diferentes soluções deixou-se incubar à temperatura ambiente em diferentes tempos, 1 h e 24 h. Após esse período de tempo, foram realizadas várias diluições (10^{-1} a 10^{-7}) para cada uma das amostras e, de seguida, usou-se a técnica da micro-gota, em que as gotas com

volume de 10 µl (em triplicado) de cada diluição foram colocadas em placas de *Petri* e estas, de seguida, foram inclinadas ligeiramente de forma a permitir o escoamento das gotas até secar completamente. Por fim, as placas de *Petri* foram colocadas na estufa a 37 °C *overnight* para permitir a contagem de unidades formadoras de colónias. Após incubação, a contagem foi efetuada manualmente.

Foram realizados três ensaios independentes (dias diferentes) e em cada ensaio foram efetuadas experiências em triplicado.

3.2.6 Correlação Entre Métodos: Densidade Ótica e Unidades Formadoras de Colónias

Inicialmente, as células foram crescidas de acordo com o descrito na subsecção 3.2.3.1. De seguida a suspensão celular foi transferida para três *Falcons* e a concentração celular ajustada por estimativa da leitura de DO aos valores de DO nominal de 0,08, 0,10 e 0,12. Seguidamente, cada solução preparada para ter uma DO nominal de 0,08, 0,10 e 0,12 foi dividida por quatro *Falcons* (total de 12 *Falcons*) com um volume de 2,5 mL e centrifugada a quatro diferentes velocidades: 6000, 6500, 7000 e 7500 rpm (cada *Falcon* centrifugado apenas a uma velocidade durante 5 min a 4 °C), obtendo-se o sobrenadante e o *pellet*. De seguida, o sobrenadante foi decantado assepticamente para novo *Falcon* e o *pellet* ressuspenso em 2,5 mL água destilada. O sobrenadante foi *vortexado* por cerca de 60 s e o *pellet* foi sonicado (Cole Parmer) de acordo com o seguinte ciclo: (10 s + 20 s) 30 % de amplitude + (20 s + 20 s) 40 % de amplitude de forma a desagregar as células. De seguida foi efetuada a leitura da DO do sobrenadante e do *pellet* a 640 nm, num espetofotometro de microplacas (Tecan Sunrise). Após a leitura das DOs, foram realizadas várias diluições (10^{-1} a 10^{-7}) para cada uma das amostras e, de seguida, usou-se a técnica de micro-gota. Por fim, as placas de *Petri* foram colocadas na estufa a 37 °C *overnight* para permitir a contagem de unidades formadoras de colónias. Após incubação, a contagem foi efetuada manualmente.

3.2.7 Eficiência da Centrifugação de *Staphylococcus aureus*

Inicialmente, as células foram crescidas de acordo com o descrito na subsecção 3.2.3.1. De seguida, a suspensão celular foi dividida e ajustada a três diferentes concentrações por estimativa da leitura da DO (0,10; 0,20; 0,60) a 640 nm num espetofotometro de microplacas(Tecan Sunrise). Um volume de 2,5 mL de cada uma das soluções foi transferido para um *Falcon* e posteriormente centrifugado a diferentes velocidades de centrifugação: 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 e 8000 rpm (foram sequencialmente preparadas oito amostras com o mesmo volume de suspensão celular e cada amostra centrifugada apenas a uma velocidade durante 5 min a 4 °C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi decantado assepticamente para um novo *Falcon* e *vortexado* por cerca de 60 s e o *pellet* foi ressuspensão assepticamente em 2,5 mL de água destilada e sonicado (Cole Parmer) de acordo com o seguinte ciclo: (10 s + 20 s) 30 % de amplitude + (20 s + 20 s) 40 % de amplitude. Por fim, foi efetuada a leitura da DO do sobrenadante e do *pellet*. Este processo foi repetido para todas as amostras após as diferentes velocidades de centrifugação.

Foram realizadas ensaios independentes (dias diferentes).

3.2.8 Análise Estatística

Para cada experiência (Avaliação da Viabilidade Celular, Correlação entre os métodos: DO e UFCs e Eficiência da Centrifugação de *Staphylococcus aureus*) são apresentados os resultados como a média das experiências com recurso ao teste *One-way ANOVA (nonparametric)* com um nível de confiança de 95 % pelo *software* GraphPad Prism[®] para Windows Vista.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Avaliação da Viabilidade Celular

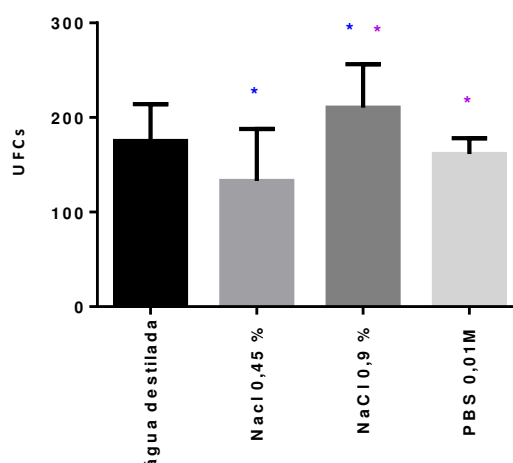
Numa primeira fase deste Capítulo foi importante verificar a viabilidade das células de *S. aureus* em água destilada. Como foi observado no Capítulo 2, a estabilidade coloidal das SPIONs AO-TMAOH-2 é mantida em água destilada até 6000 rpm. A estabilidade coloidal das AO-TMAOH-2 em água destilada, por comparação com

soluções salinas, pode simplificar a observação das interações entre as SPIONs e as células. Na literatura, as soluções salinas são normalmente usadas em ensaios para manter a viabilidade de *Staphylococcus* (Koch, 1942; Chapman, 1945; Smith, 1958). A água destilada não é comumente usada nesses estudos, no entanto foi importante verificar a viabilidade celular nestas condições experimentais, tendo em conta o objetivo final deste trabalho.

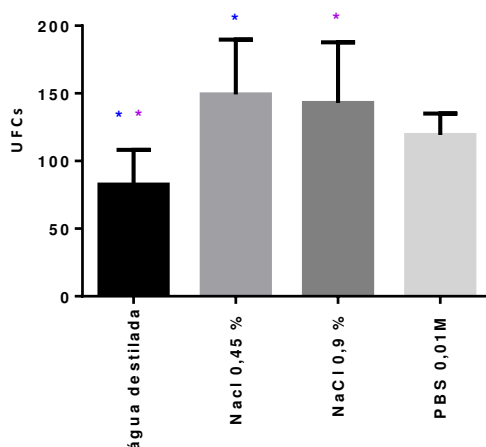
Para avaliar a viabilidade celular em água destilada foi usado o método de contagem de UFCs. Este método permite observar diretamente a viabilidade celular, uma vez que apenas as células viáveis são capazes de crescer no meio de cultura sólido. A mínima observação de crescimento de colónias em água destilada pode confirmar que pelo menos algumas células sobrevivem. Além disso, o resultado quantitativo de contagem de UFCs em água destilada e em soluções salinas pode proporcionar uma comparação quantitativa da viabilidade celular.

No gráficos da **Figura 3.3 e Figura 3.4** apresentam-se os resultados da contagem de UFCs de *S. aureus* nas quatro diferentes soluções testadas (NaCl 0,9 %, NaCl 0,45 %, PBS 0,01 M e água destilada), após incubação durante 1 h e 24 h, respetivamente, em três experiências independentes (dias diferentes). Cada experiência foi efetuada em triplicado (Ensaio 1, Ensaio 2 e Ensaio 3).

Ensaio 1



Ensaio 2



Ensaio 3

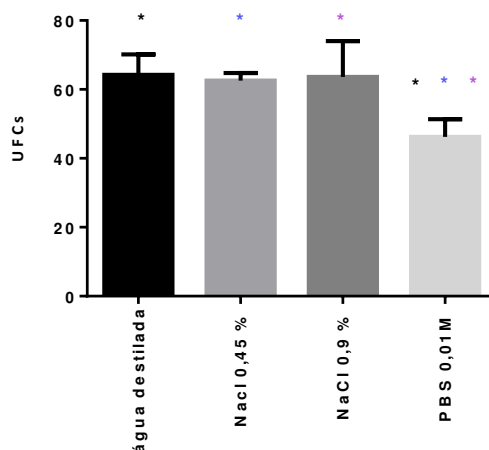
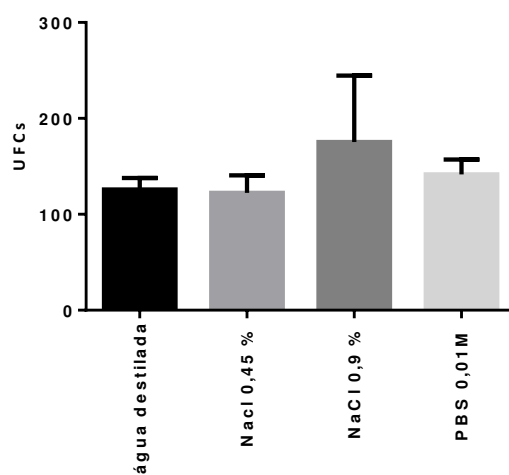


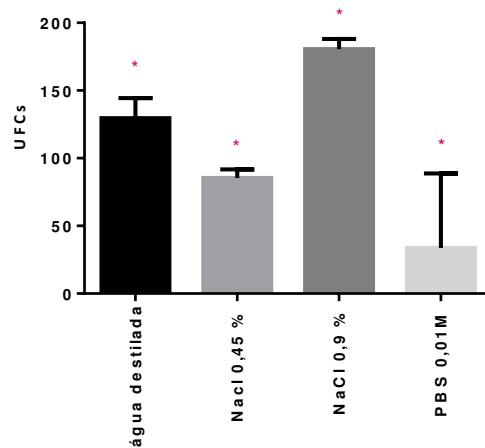
Figura 3.3 – Viabilidade celular de *S. aureus* em água destilada, NaCl 0,45 %, NaCl 0,9 % e PBS 0,01 M, após 1h.

O gráfico apresenta a contagem de UFCs de *S. aureus* após 1 h em água destilada, NaCl 0,45 %, NaCl 0,9 % e PBS 0,01 M, em três experiências independentes. As cores dos símbolos (*) correspondem à diferença significativa da viabilidade celular nas diferentes soluções. Por exemplo, no gráfico do Ensaio 1, a cor azul (*) representa a diferença estatisticamente significativa da viabilidade celular de *S. aureus* nas soluções de NaCl 0,45 % e NaCl 0,9 %. A cor (*) roxa representa a diferença estatisticamente significativa da viabilidade celular de *S. aureus* nas soluções de NaCl 0,9 % e PBS 0,01 M. No gráfico do Ensaio 2, a cor azul (*) representa a diferença estatisticamente significativa da viabilidade celular de *S. aureus* nas soluções de NaCl 0,45 % e água destilada e a cor roxa (*) representa a diferença estatisticamente significativa da viabilidade celular de *S. aureus* nas soluções de NaCl 0,9 % e água destilada. No gráfico do Ensaio 3, a cor preta (*) indica que a viabilidade celular em água destilada é estatisticamente diferente da viabilidade celular em PBS 0,01 M. A cor azul (*) representa a diferença estatisticamente significativa da viabilidade celular de *S. aureus* nas soluções de NaCl 0,45 % e PBS 0,01 M. A cor roxa (*) representa a diferença estatisticamente significativa da viabilidade celular de *S. aureus* nas soluções de NaCl 0,9 % e PBS 0,01 M.

Ensaio 1



Ensaio 2



Ensaio 3

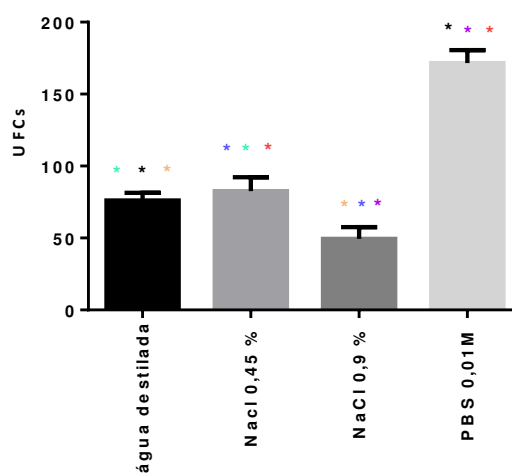


Figura 3.4 – Viabilidade celular de *S. aureus* em água destilada, NaCl 0,45 %, NaCl 0,9 % e PBS 0,01 M, após 24h.
O gráfico apresenta a contagem de UFCs de *S. aureus* após 24 h em água destilada, NaCl 0,45 %, NaCl 0,9 % e PBS 0,01 M, em três ensaios independentes. As cores dos símbolos (*) correspondem à diferença significativa da viabilidade celular nas diferentes soluções. Por exemplo, no gráfico do Ensaio 1, não existem diferenças

significativas. No gráfico do Ensaio 2, a cor bordô (*) presente em todas as soluções representa que todas têm diferenças estatisticamente entre si. No gráfico do Ensaio 3, a cor preta (*) significa que a viabilidade celular em água destilada é estatisticamente diferente do PBS 0,01 M, e a cor azul (*) significa que existe diferença significativa na viabilidade celular nas soluções de NaCl 0,45% e NaCl 0,9%, a cor verde (*) significa que o NaCl 0,45 % é estatisticamente diferente da água destilada, a cor amarela (*) significa que existe diferença significativa na viabilidade celular nas soluções de água destilada e NaCl 0,9%, a cor rosa (*) significa que existe diferença significativa na viabilidade celular nas soluções de PBS 0,01 M e NaCl 0,9 % e a cor vermelha (*) significa que existe diferença significativa na viabilidade celular nas soluções de PBS 0,01 M e NaCl 0,9 %.

Observando os gráficos da **Figura 3.3** (Ensaio 1 e Ensaio 3 de 1 h) e da **Figura 3.4** (Ensaio 2 e Ensaio 3 de 24 h) verifica-se que a contagem do número de UFCs é significativamente diferente nas soluções salinas. As soluções salinas são normalmente usadas em protocolos *standards* para ensaios com *Staphylococcus*, pelo que seria expectável obter resultados semelhantes. Dado que a contagem de UFCs difere significativamente em soluções salinas, que constituem neste estudo algo como um “controlo positivo”, torna-se difícil comparar estes valores com os obtidos para as contagens de UFCs em água destilada. Com estes resultados não é, portanto, possível retirar conclusões finais sobre a similaridade da viabilidade das células em água destilada e em soluções salinas.

No entanto, algo que se pode observar em todos os gráficos é o crescimento de colónias nas diferentes soluções salinas, mas também em água destilada. A água destilada não é particularmente especial no comportamento celular de *S. aureus* em comparação com as soluções salinas mas, em alguns ensaios, a água destilada corresponde à melhor solução e percebe-se que algumas células mantêm a viabilidade. Se a água destilada matasse as células bacterianas seria observável pelos gráficos a contagem de UFCs em água destilada abaixo das soluções salinas em todos os ensaios. Porém, em alguns ensaios, observa-se a contagem de UFCs nas soluções salinas abaixo da contagem em água destilada. Estes resultados sugerem fortemente que a água destilada não diminui a viabilidade de *S. aureus*, em comparação com as soluções salinas testadas.

A variabilidade das medições nas soluções salinas e em água destilada indica que o método de contagem de UFCs não está a funcionar de forma fiável para estas amostras. Esta variabilidade não permite verificar que a viabilidade em água destilada é equivalente à viabilidade em soluções salinas. No entanto, os dados nas **Figuras 3.3** e

3.4 indicam que colónias de *S. aureus* suficientes permaneceram viáveis em água destilada para se proceder com as experiências necessárias neste projeto.

As **Tabelas 3.1 e 3.2** apresentam os valores obtidos, em todas as experiências, da contagem de UFCs de *S. aureus* incubadas durante 1 h e 24 h, respetivamente em água destilada, NaCl 0,45 %, NaCl 0,9 % e PBS 0,01 M.

Tabela 3.1 – Valores obtidos da contagem de UFCs da suspensão celular incubada 1h em diferentes soluções. A suspensão celular ajustada à DO≈0,10. O símbolo (-) representa a impossibilidade de contagem de colónias (superior a 300 colónias). Os números de cor vermelha são representativos de valores com grandes variações na mesma solução. Os números de cor verde são representativos de valores semelhantes entre as diferentes soluções. Apresentam-se três ensaios independentes (dias diferentes) e em cada ensaio foi usada a técnica da micro-gota, em que três gotas foram colocadas em cada placa de *Petri*. Foram usadas três placas de *Petri* para cada solução.

Soluções	Água Destilada	NaCl 0,45 %	NaCl 0,9 %	PBS 0,01 M
Ensaio 1	Contagem de Unidades Formadoras de Colónias			
	250	81	234	181
	180	99	178	151
	152	23	224	172
	205	178	156	-
	153	151	166	132
	189	194	165	176
	187	166	240	-
	120	167	239	159
	140	136	291	158

Ensaio 2	78	170	117	118
	66	182	124	115
	71	141	129	101
	120	186	154	104
	109	146	138	103
	125	171	222	116
	59	138	170	120
	77	-	172	125
	56	-	-	140

Ensaio 3	70	64	76	37
	65	60	60	45
	67	63	53	45
	61	65	50	47
	64	64	74	50
	69	63	55	48
	65	59	73	40
	50	-	68	51
	67	-	-	53

Tabela 3.2 – Valores obtidos da contagem de UFCs da suspensão celular incubada 24h em diferentes soluções. A suspensão celular ajustada à DO≈0,10. O símbolo (-) representa a impossibilidade de contagem de colônias (superior a 300 colônias). Os números de cor vermelha realçam os valores com grandes variações na mesma solução. Os números de cor azul realçam os valores com pequenas variações em cada uma das soluções mas, em média são muito diferentes entre as diferentes soluções. Apresentam-se três ensaios independentes (dias diferentes) e em cada ensaio foi usada a técnica da micro-gota, em que três gotas foram colocadas em cada placa de *Petri*. Foram usadas três placas de *Petri* para cada solução.

Soluções	Água Destilada	NaCl 0,45 %	NaCl 0,9 %	PBS 0,01 M
Ensaio 1	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias			
	129	120	236	151
	146	137	273	157
	130	140	260	151
	115	116	144	158
	124	123	126	128
	135	86	144	130
	120	134	102	116
	108	-	118	142
	-	-	-	-

Ensaio 2	110	91	170	15
	118	84	179	10
	123	88	183	11
	137	89	193	20
	150	89	181	18
	139	91	177	11
	-	79	-	19
	-	72	-	20
	-	86	-	18

Ensaio 3	76	82	55	160
	73	86	51	167
	87	88	51	180
	70	90	51	170
	77	86	37	181
	75	68	35	-
	75	93	58	-
	-	68	57	-
	-	-	50	-

Observa-se nas **Tabelas 3.1 e 3.2** que, em alguns ensaios (Ensaio 3 – 1h), existem valores de UFCs semelhantes entre as soluções e, em cada solução, verifica-se uma pequena variação. Porém, noutros ensaios (Ensaio 2, Ensaio 3 – 24 h), cada uma das soluções tem uma pequena variação no número de UFCs contados, mas em médias muito diferentes entre as soluções. Por último, em alguns ensaios (Ensaio 1, Ensaio 2 – 1 h, e Ensaio 1 – 24 h), as variações são grandes mesmo na própria solução.

A análise de todos os resultados permite concluir que as contagens de UFCs são muito variáveis nestas soluções, de modo que o método de contagem de UFCs não produziu resultados consistentes neste trabalho, colocando a hipótese da agregação celular não ser controlada de forma consistente para baixas concentrações celulares. As limitações do método de contagem de UFCs a baixas concentrações celulares serão melhor discutidas na subsecção 3.3.2.

3.3.2 Correlação Entre Métodos: Densidade Ótica e Unidades Formadoras de Colônias

A curva de calibração apresentada na **Figura 3.1** mostra que para os valores de DO elevados a correlação entre a leitura de DO e a contagem de UFCs é coerente mas, para valores mais baixos (**Figura 3.2**) a correlação não é tão coerente. Dada a concentração celular de interesse neste projeto se encontrar no limite inferior da curva de calibração da *S. aureus* considerou-se importante estudar a correlação entre o método de leitura de DO e o método de contagem de UFCs para valores de concentrações celulares baixas. Para verificar a correlação entre os dois métodos foram preparadas três amostras com o propósito de terem uma diferença de 20 % no valor nominal da concentração celular.

Os resultados obtidos pela leitura de DO das amostras e a contagem de UFCs estão apresentados nas **Tabelas 3.3 e 3.4** respectivamente.

Tabela 3.3 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do *pellet*. Os valores de cor cinza realçam a soma do número de UFCs do sobrenadante e do *pellet* próxima do valor de DO obtido da leitura da DO da amostra da suspensão celular inicial

Velocidade de Centrifugação (rpm)	DO Suspensão Celular Inicial	DO Sobrenadante	DO <i>Pellet</i>
6000	0,08	0,05	0,05
6000	0,09	0,05	0,05
6000	0,12	0,05	0,05
6500	0,06	0,02	0,05
6500	0,08	0,04	0,06
6500	0,12	0,05	0,05
7000	0,07	0,04	0,05
7000	0,08	0,04	0,05
7000	0,11	0,04	0,05
7500	0,06	0,04	0,04
7500	0,07	0,05	0,07
7500	0,13	0,04	0,10

Analisando os valores da leitura da DO da suspensão celular inicial e os valores obtidos após diferentes velocidades de centrifugação, na **Tabela 3.3**, observa-se que a

soma dos valores de DO do sobrenadante e do *pellet* corresponde aproximadamente ao valor de DO da suspensão celular inicial. Este facto parece indicar que o processo de centrifugação não altera dramaticamente a concentração de células medida, de forma indireta, por leitura de DO. Contudo, é importante salientar que os valores de DO obtidos após as diferentes velocidades de centrifugação são valores de DO próximos de 0,05, correspondendo a valores muito próximos do limite de sensibilidade do aparelho de medição existindo, assim, a incerteza desse valor variar entre 0,00 e 0,05. Portanto, estes valores de DO medidos não podem ser utilizados para estimar com fiabilidade a eficiência de centrifugação.

Na **Tabela 3.4** apresentam-se os valores obtidos pela contagem de UFCs da suspensão celular inicial (antes da centrifugação) e valores obtidos pela contagem de UFCs do sobrenadante e do *pellet*. Esta experiência decorreu em paralelo com a experiência da leitura de DO a partir das mesmas amostras.

Tabela 3.4 – Valores obtidos pela contagem de UFCs da suspensão celular inicial (antes da centrifugação) e valores obtidos pela contagem de UFCs do sobrenadante e do *pellet*.

Os valores de cor cinza são representativos dos ensaios em que a soma do sobrenadante e do *pellet* é drasticamente menor que o valor de UFCs obtido na amostra da suspensão celular inicial.

Os valores de cor azul são representativos dos ensaios em que a soma do número de UFCs do sobrenadante e do *pellet* é maior que o valor de UFCs obtido na amostra da suspensão celular inicial.

Velocidade de centrifugação (rpm)	UFCs Suspensão Celular Inicial	UFCs Sobrenadante	UFCs <i>Pellet</i>
6000	109		22
6000	48	2	8
6000	54		6
6500	28		8
6500	27	2	11
6500	48		9
7000	30		28
7000	29	11	28
7000	40		46
7500	61		44
7500	66	36	71
7500	101		67

Observando os valores da contagem de UFCs da amostra da suspensão celular inicial e os valores obtidos após a centrifugação da amostra nas diferentes velocidades de centrifugação, na **Tabela 3.4**, verifica-se, em algumas situações, que a soma do número de UFCs do sobrenadante e do *pellet* é maior que o valor de UFCs obtido na amostra da suspensão celular inicial (cor vermelha). Em alguns casos, porém, esse valor é drasticamente menor (cor verde).

É possível concluir pelos resultados obtidos pelo método de contagem de UFCs que este método não permite controlar a média de agregados celulares numa amostra. Pelo método de leitura de DO, em nenhum caso se verifica um aumento e/ou diminuição drástica de valores de DO como observado pelo método de contagem de UFCs.

Os valores da suspensão inicial obtidos pela leitura de DO e pela contagem de UFCs apresentados nas **Tabelas 3.3** e **3.4** foram analisados estatisticamente e os resultados encontram-se apresentados nas **Figura 3.5** e **Figura 3.6**, respectivamente.

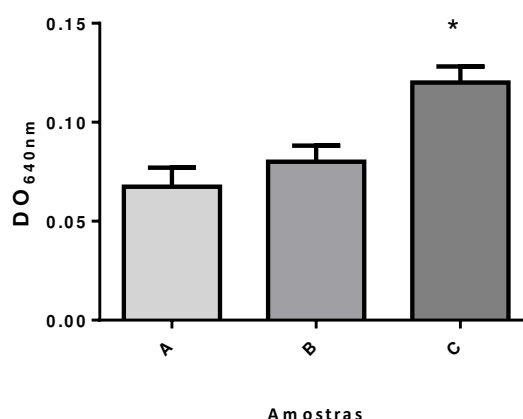


Figura 3.5 – Medição de três amostras pela leitura da DO a 640_{nm}.

As amostras A, B e C foram preparadas para terem DOs nominais de 0,08, 0,10 e 0,12, respectivamente.

O símbolo (*) representa que a amostra C é diferente significativamente quando comparada com as amostras A e B.

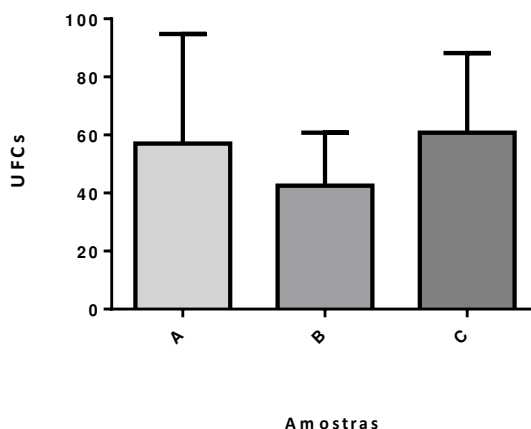


Figura 3.6 – Medição de três amostras pela contagem de UFCs.

As amostras A, B e C foram preparadas para terem DOs nominais de 0,08, 0,10 e 0,12, respetivamente.

Analisando os resultados obtidos pelos diferentes métodos, para as mesmas amostras de suspensão celular inicial, verifica-se uma tendência crescente de valores no gráfico obtido pelo método de leitura de DO (**Figura 3.5**). É possível observar pela análise estatística que a amostra **C** é estatisticamente diferente (*) ($p < 0,05$) das amostras **A** e **B**. No entanto, não existe uma diferença significativa entre as amostras **B** e **C**. Como explicado na introdução deste Capítulo (subsecção 3.1), esta análise permite confirmar que a incerteza do método de leitura de DO é de aproximadamente 0,02, verificando-se alguma sobreposição dos valores, mas não uma sobreposição completa. Isto significa que, pelo método de leitura de DO para valores baixos de concentração celular, são obtidos resultados diferentes ao medir as diferentes amostras preparadas para terem diferentes concentrações por aproximadamente 20 % da DO de 0,10. Porém, nos resultados apresentados na **Figura 3.5**, é possível afirmar que existe, dentro de certos limites, uma relação linear entre a absorbância da suspensão celular e o número total de células por mL da suspensão. No entanto, existe uma dificuldade em medir com precisão os valores de concentrações celulares baixos devido ao valor do limite de sensibilidade do aparelho ser próximo da medição obtida pela leitura da DO das amostras.

A análise estatística dos resultados obtidos pelo método de contagem de UFCs indica que não existem diferenças significativas no número de UFCs e, como se pode observar pelo gráfico da **Figura 3.6**, não existe uma tendência crescente entre os valores. Este resultado confirma que o valor de incerteza do método de contagem de UFCs é maior que 0,2. Pode-se então concluir que não é possível uma medição distinta

para as três amostras comparadas, e que os valores se sobrepõem de forma significativa entre as medições. A variabilidade em cada medição é muito maior para o método de contagem de UFCs do que para o método de DO. Esta elevada variabilidade das contagens de UFC para as amostras de baixa concentração é consistente com os resultados obtidos na subsecção 3.3.1.

3.3.3 Eficiência da Centrifugação de *Staphylococcus aureus*

Na última fase deste Capítulo foi importante verificar a eficiência da centrifugação das células de *S. aureus* em água destilada. Como foi observado nos resultados do Capítulo 2, a estabilidade coloidal das SPIONs AO-TMAOH-2 é mantida em água destilada até à velocidade de centrifugação de 6000 rpm. A elevada estabilidade coloidal das AO-TMAOH-2 em água destilada num valor inferior a 6000 rpm pode permitir a observação das interações entre as SPIONs e as células de *S. aureus* se, a essa velocidade de centrifugação (inferior a 6000 rpm), for obtida a compactação de um número razoável de células de *S. aureus*. Na literatura existe a informação de que normalmente se assumem velocidades elevadas de centrifugação para a compactação de células bacterianas particular (Allan e Pearce, 1979; Romaní *et al.*, 2008; Van der Mei *et al.*, 2008). De forma a confirmar esta informação, foi necessário o estudo da eficiência da centrifugação das células de *S. aureus* em diferentes velocidades de centrifugação.

Como já referido na introdução deste Capítulo, a baixa concentração celular é importante para a observação por SEM de células individuais para o estudo da interação entre *S. aureus* e NPs, mas, dada a dificuldade verificada na subsecção anterior em obter resultados consistentes para concentrações celulares baixas pelo método de leitura de DO, nesta fase foram usadas concentrações iniciais mais elevadas ($DO \approx 0,60$) de forma a tentar garantir a fiabilidade dos resultados.

Os resultados apresentados na **Tabela 3.5** correspondem a valores obtidos pela leitura da DO de suspensões celulares iniciais (antes da centrifugação) e valores da DO obtidos para o sobrenadante e para o *pellet* após a centrifugação da suspensão inicial, a diferentes velocidades.

Tabela 3.5 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial ($DO \approx 0,60$) (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do *pellet* após a centrifugação da suspensão celular a diferentes velocidades.

Apresentam-se os resultados de dois ensaios independentes (dias diferentes).

Velocidade de centrifugação (rpm)	Suspensão Celular (Inicial)	Suspensão Celular (Sobrenadante)	Suspensão Celular (<i>Pellet</i>)	% <i>Pellet</i>
Leitura da Densidade ótica				
1000	0,66	0,54	0,11	16,67
2000	0,65	0,3	0,30	46,15
3000	0,66	0,06	0,47	71,21
4000	0,65	0,04	0,60	92,31
5000	0,63	0,02	0,52	82,54
6000	0,64	0,01	0,59	92,19
7000	0,64	0,01	0,58	90,63
8000	0,64	0,00	0,55	91,67
1000	0,71	0,59	0,16	22,54
2000	0,72	0,21	0,5	69,44
3000	0,71	0,15	0,54	76,06
4000	0,71	0,02	0,62	87,32
5000	0,71	0,04	0,62	87,32
6000	0,71	0,01	0,64	90,14
7000	0,72	0,02	0,69	95,83
8000	0,71	0,01	0,68	95,77

Os valores da percentagem de *pellet* obtidos nas diferentes velocidades apresentados na **Tabela 3.5** foram analisados estatisticamente e os resultados encontram-se apresentados na **Figura 3.7**.

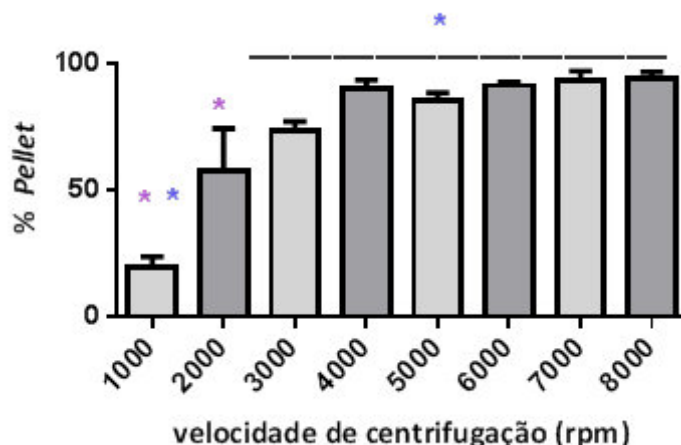


Figura 3.7 – Formação de *pellet* de células de *S. aureus* a diferentes velocidades de centrifugação. Suspensão celular com concentração inicial de $DO \approx 0,60$.

Os símbolos (*) correspondem à diferença significativa da percentagem de *pellet* nas diferentes velocidades. A cor roxa (*) nas velocidades de 1000 e 2000 rpm, representa a diferença significativa nos valores de percentagem de *pellet* formado após as células serem centrifugadas a estas velocidades. A cor azul (*) representa uma diferença significativa entre os valores de percentagem de *pellet* nas duas velocidades (1000 - 2000 rpm) comparativamente com os valores de percentagem de *pellet* nas velocidades (3000-8000 rpm). Nas velocidades de 3000 a 8000 rpm não existem diferenças estatisticamente significativas nos valores de percentagem de *pellet*.

Através da análise estatística verifica-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de percentagem de *pellet* obtidos nas velocidades mais baixas (1000 e 2000 rpm). Existe também diferença significativa entre os valores de percentagem de *pellet* obtidos na velocidade de 1000 rpm e nas velocidades de 3000 a 8000 rpm. Nas velocidades entre 3000 e 8000 rpm não existem diferenças estatisticamente significativas de percentagem de *pellet* formado.

É possível concluir que o processo de centrifugação é mais eficiente para o intervalo de velocidades entre 3000 a 8000 rpm. Esta eficiência na formação de *pellet*, praticamente constante acima de 3000 rpm, indica um *threshold* de formação de *pellet* a 3000 rpm. Após verificados estes resultados foram realizados novos ensaios usando apenas três velocidades de centrifugação (1000, 4000 e 6000 rpm) com valores de $DO \approx 0,60$ com o propósito de verificar se a centrifugação à velocidade de 4000 rpm, velocidade acima do *threshold* de 3000 rpm para formação de *pellet*, seria tão eficiente como na velocidade de 6000 rpm. O objetivo desta experiência foi também o de confirmar a existência de diferenças significativas nos valores de percentagem de *pellet* formado à velocidade de 1000 rpm quando comparada com as percentagens de *pellet* obtidas nas velocidades de centrifugação de 4000 e 6000 rpm.

Os resultados obtidos para os valores de DO da suspensão celular inicial (antes da centrifugação) e para os valores de DO do sobrenadante e do *pellet* após a suspensão celular inicial ser centrifugada nas três diferentes velocidades encontram-se apresentados na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.6 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial ($DO \approx 0,60$) (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do *pellet* após a centrifugação da suspensão celular a 1000, 4000 e 6000 rpm. Apresentam-se os resultados de três ensaios independentes (dias diferentes).

Velocidade de centrifugação (rpm)	Suspensão celular (Inicial)	Suspensão celular (Sobrenadante)	Suspensão celular (<i>Pellet</i>)	% <i>Pellet</i>
Leitura da Densidade ótica				
1000	0,58	0,44	0,14	24,14
4000	0,57	0,01	0,54	94,74
6000	0,57	0,01	0,52	91,23
1000	0,63	0,47	0,16	25,40
4000	0,60	0,02	0,56	93,33
6000	0,57	0,02	0,51	89,47
1000	0,65	0,50	0,19	29,23
4000	0,64	0,01	0,61	95,31
6000	0,58	0,00	0,56	96,55

Os valores de percentagem de *pellet* apresentados na **Tabela 3.6** foram analisados estatisticamente e encontram-se apresentados na **Figura 3.8**.

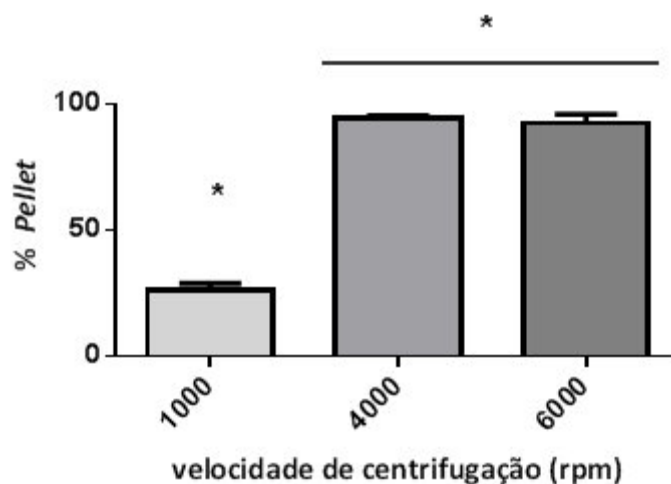


Figura 3.8 – Formação de *pellet* de *S. aureus* em três diferentes velocidades de centrifugação (rpm). Suspensão celular com concentração inicial de $DO \approx 0,60$.

O símbolo (*) corresponde à diferença significativa da percentagem de *pellet* nas diferentes velocidades. Existe uma diferença significativa (*) na percentagem de *pellet* obtida na velocidade de 1000 rpm comparativamente com as percentagens obtidas nas velocidades de 4000 e 6000 rpm. Nas velocidades de 4000 e 6000 rpm não existem diferenças estatisticamente significativas entre si.

Pela análise dos resultados do gráfico da **Figura 3.8** verifica-se que as percentagens de *pellets* obtidas após centrifugação da suspensão celular às velocidades de 4000 e 6000 rpm não têm diferenças estatisticamente significativas. É confirmada uma diferença significativa (*) ($p < 0,05$) da percentagem de *pellet* obtida a 1000 rpm comparativamente com a percentagem de *pellet* obtida nas velocidades de 4000 e 6000 rpm. Na velocidade de 4000 é confirmada de forma consistente e reprodutível a formação de *pellet* das células de *S. aureus* em água destilada.

De seguida, a eficiência da centrifugação foi determinada para valores de concentrações mais baixos ($DO \approx 0,20$) e os resultados estão apresentados na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial ($DO \approx 0,20$) (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do *pellet* após a centrifugação da suspensão celular a diferentes velocidades.

Apresentam-se os resultados de dois ensaios independentes (dias diferentes).

Velocidade de centrifugação (rpm)	Suspensão Celular (Inicial)	Suspensão Celular (Sobrenadante)	Suspensão Celular (<i>Pellet</i>)	% <i>Pellet</i>
Leitura da Densidade ótica				
1000	0,18	0,15	0,02	11,11
2000	0,19	0,14	0,02	10,53
3000	0,18	0,09	0,07	38,89
4000	0,19	0,08	0,09	47,37
5000	0,19	0,05	0,09	47,37
6000	0,19	0,05	0,06	31,58
7000	0,18	0,02	0,08	44,44
8000	0,19	0,02	0,14	73,68
1000	0,19	0,15	0,01	5,26
2000	0,20	0,11	0,04	20,00
3000	0,18	0,12	0,01	5,56
4000	0,18	0,09	0,03	16,67
5000	0,20	0,07	0,05	25,00
6000	0,16	0,06	0,08	50,00
7000	0,19	0,04	0,07	36,84
8000	0,17	0,01	0,09	52,94

Os valores de percentagem de *pellet* apresentados na **Tabela 3.7** foram analisados estatisticamente e encontram-se apresentados na **Figura 3.9**.

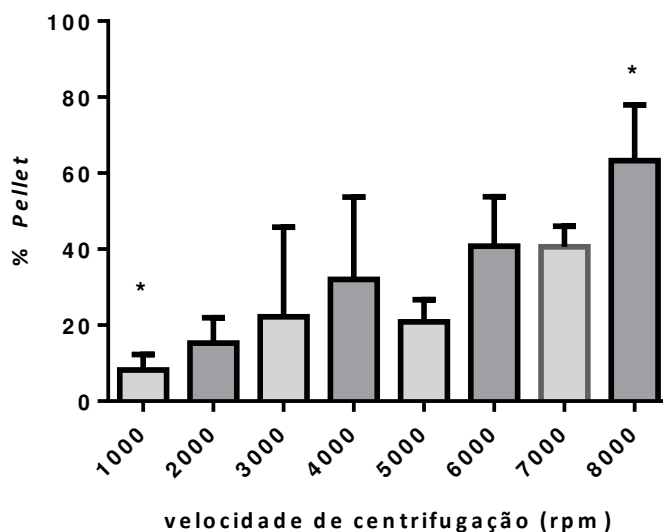


Figura 3.9 – Formação de *pellet* de *S. aureus* em diferentes velocidades de centrifugação (rpm). Suspensão celular com concentração inicial de $DO \approx 0,20$.

Existe uma diferença significativa (*) nas percentagens de *pellets* obtidas na velocidade de 1000 rpm e na velocidade de 8000 rpm. Nas velocidades de 1000 a 7000 rpm não existem diferenças estatisticamente significativas nos valores de percentagem de *pellet* formado.

Observando os resultados apresentados no gráfico da **Figura 3.9** é possível verificar que para uma gama de valores de concentração celular baixa não se verificam resultados consistentes como em valores de concentrações celulares mais elevados (**Figura 3.7**). Pela análise do gráfico da **Figura 3.9** existem diferenças significativas (*) ($p < 0,05$) na percentagem *pellet* obtida à velocidade de 1000 rpm quando comparada com a percentagem obtida a 8000 rpm. Porém, não existem diferenças na percentagem de *pellet* nas restantes velocidades. Este resultado pode ser justificado pelo valor obtido através da leitura da DO do *pellet* ser próximo do limite de sensibilidade. Para uma melhor compreensão destes resultados para concentrações celulares baixas e para tentar perceber se o limite de sensibilidade do aparelho de medição pode realmente afetar a medição dos resultados, foram efetuadas mais experiências determinando a eficiência da centrifugação para concentrações celulares com $DO \approx 0,10$. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 3.8**.

Tabela 3.8 – Valores obtidos pela leitura da DO da suspensão celular inicial ($DO \approx 0,10$) (antes da centrifugação) e valores obtidos pela leitura da DO do sobrenadante e do *pellet* após a centrifugação da suspensão celular a diferentes velocidades.

Apresentam-se os resultados de dois ensaios independentes (dias diferentes).

Velocidade de centrifugação (rpm)	Suspensão Celular (Inicial)	Suspensão Celular (Sobrenadante)	Suspensão Celular (<i>Pellet</i>)	% <i>Pellet</i>
Leitura da Densidade ótica				
1000	0,09	0,08	0,00	0,00
2000	0,08	0,04	0,01	12,50
3000	0,08	0,02	0,04	50,00
4000	0,09	0,00	0,05	55,56
5000	0,08	0,00	0,03	37,50
6000	0,07	0,01	0,04	57,14
7000	0,10	0,02	0,05	50,00
8000	0,12	0,01	0,07	58,33
1000	0,08	0,07	0,00	0,00
2000	0,09	0,03	0,00	0,00
3000	0,08	0,00	0,00	0,00
4000	0,08	0,01	0,02	25,00
5000	0,07	0,00	0,01	14,29
6000	0,07	0,00	0,02	28,57
7000	0,07	0,00	0,03	42,86
8000	0,07	0,00	0,02	28,57

Os valores obtidos de percentagem de *pellet* apresentados na **Tabela 3.8** foram analisados estatisticamente e encontram-se apresentados na **Figura 3.10**.

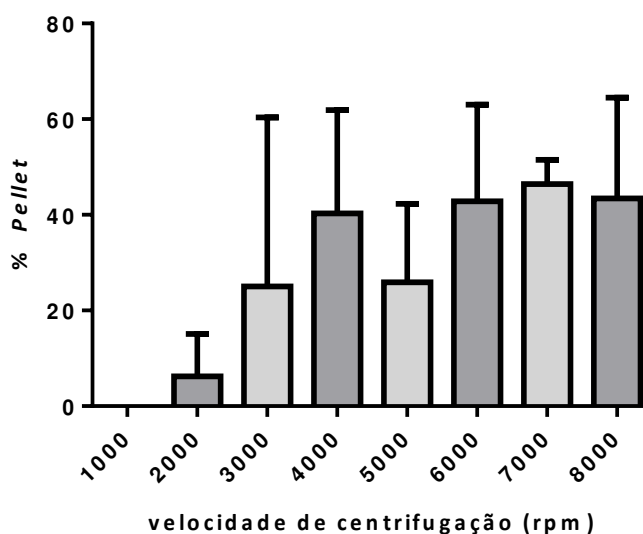


Figura 3.10 – Formação de *pellet* de *S. aureus* a diferentes velocidades de centrifugação (rpm). Suspensão celular com concentração inicial de $DO \approx 0,10$. Não existem diferenças significativas na percentagem de *pellet* nas diferentes velocidades.

Através da análise do gráfico da **Figura 3.10** é verificado mais uma vez o problema do limite de sensibilidade afetar a medição de valores de suspensões com concentrações celulares baixas. Pela observação do gráfico da **Figura 3.10** nenhum resultado obtido referente à percentagem de *pellet* é estatisticamente significativo ($p > 0,05$), mas é observada uma semelhança de perfis entre os gráficos das **Figuras 3.7 e 3.10**. Por outras palavras, nas velocidades mais baixas de centrifugação foi obtida uma menor percentagem de *pellet* e nas velocidades mais elevadas a percentagem de *pellet* foi ligeiramente maior.

A percentagem de *pellet* obtido não foi igual a 100 % em nenhuma experiência efetuada muito provavelmente devido às limitações do aparelho de medição. Nas concentrações celulares elevadas a percentagem de *pellet* foi de quase 100 % mas, nas concentrações celulares mais baixas não se sabe o quão próximo é de 100 %. Para que fosse possível prosseguir com os estudos assumiu-se que os diferentes resultados de formação de *pellet* obtidos a partir de diferentes concentrações celulares iniciais ($DO \approx 0,10$; $DO \approx 0,20$ e $DO \approx 0,60$) serão resultado das limitações de leitura do aparelho e assumiu-se a realização das experiências seguintes com concentrações de *S. aureus* baixas tendo por base o *threshold* de formação de *pellet* obtido nas experiências com concentrações celulares elevadas.

3.4 Conclusão

O presente capítulo focou-se em três grandes objetivos: a determinação da viabilidade celular de *S. aureus* em água destilada; estudo da correlação entre o método de leitura de DO e da contagem de UFCs, e a avaliação da eficiência da centrifugação de células de *S. aureus*.

Em resumo, as principais conclusões dos diferentes trabalhos experimentais são as seguintes:

- 1) O método de contagem de UFCs não demonstrou ser um método sensível para quantificar a viabilidade celular de *S. aureus* a baixas concentrações celulares, em diferentes soluções. No entanto, os resultados indicam que a viabilidade de *S. aureus* em água destilada é suficiente para prosseguir com as experiências planeadas para o Capítulo 4.
- 2) O método de leitura de DO é o método mais sensível para suspensões celulares com concentrações celulares baixas ($DO \approx 0,10$) quando comparado com o método de contagem de UFCs.
- 3) A formação de *pellet* formada acima do *threshold* de 3000 rpm é de 95 % em concentrações celulares elevadas ($DO \approx 0,60$), que se mantêm relativamente constante até à velocidade testada mais elevada.

Estabelecido o *threshold* de velocidades para a formação de *pellet* nas células de *S. aureus* pode, então, ser escolhida a velocidade de centrifugação mais apropriada para permitir uma boa separação entre células bacterianas e SPIONs livres. Note-se que, se as SPIONs e as células não tivessem diferentes *thresholds* de velocidades, não seria possível uma boa separação. A percentagem de formação de *pellet* de *S. aureus* constante nas velocidades acima de 3000 rpm é muito útil, uma vez que sugere a flexibilidade na escolha do valor da velocidade ideal para a separação, ao invés de simplesmente usar a máxima velocidade, como é comumente feito para a recolha/compactação das células bacterianas.

A realização de experiências como a determinação da estabilidade coloidal das NPs a diferentes velocidades de centrifugação no Capítulo 2, e as experiências de eficiência da centrifugação realizadas para as células no presente Capítulo foram importantes porque se as SPIONs e as células fossem caracterizadas em amostras mistas seria muito mais trabalhoso e moroso.

CAPÍTULO 4

OBSERVAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS SPIONs e
Staphylococcus aureus POR MICROSCOPIA
ELETRÓNICA DE VARRIMENTO

4.1 Introdução

Desenvolver um método que permita estudar as interações entre células de *S. aureus* e SPIONs é o objetivo fulcral desta dissertação. Como já foi explicado com mais detalhe no Capítulo 1, a interação entre os bactérias e NPs ainda se encontra pouco compreendida. Para uma investigação mais aprofundada sobre a existência de ligação/interação de NPs com as células bacterianas, a microscopia eletrônica parece ser uma potencial ferramenta a usar. Este tipo de microscopia produz imagens de alta resolução permitindo assim, a análise de componentes com diferentes escalas: micrométrica (característica das células bacterianas) (Tani *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 2003; Bergmans *et al.*, 2005; Josiane *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2009; Kaivosoja *et al.*, 2012) e nanométrica (característica das NPs) em simultâneo (Lead e Wilkinson, 2006; Domingos *et al.*, 2009; Krishna *et al.*, 2011; Laura *et al.*, 2013).

Um protocolo que possibilite a observação/análise da interação entre células bacterianas e NPs por observação por SEM é um desafio promissor mas, difícil de ser conseguido devido à dificuldade da otimização de parâmetros físico - químicos das NPs em conjunto com células bacterianas. Na **Figura 4.1** é demonstrada a dificuldade em observar a interação de NPs de prata juntamente com células de *Escherichia coli*.

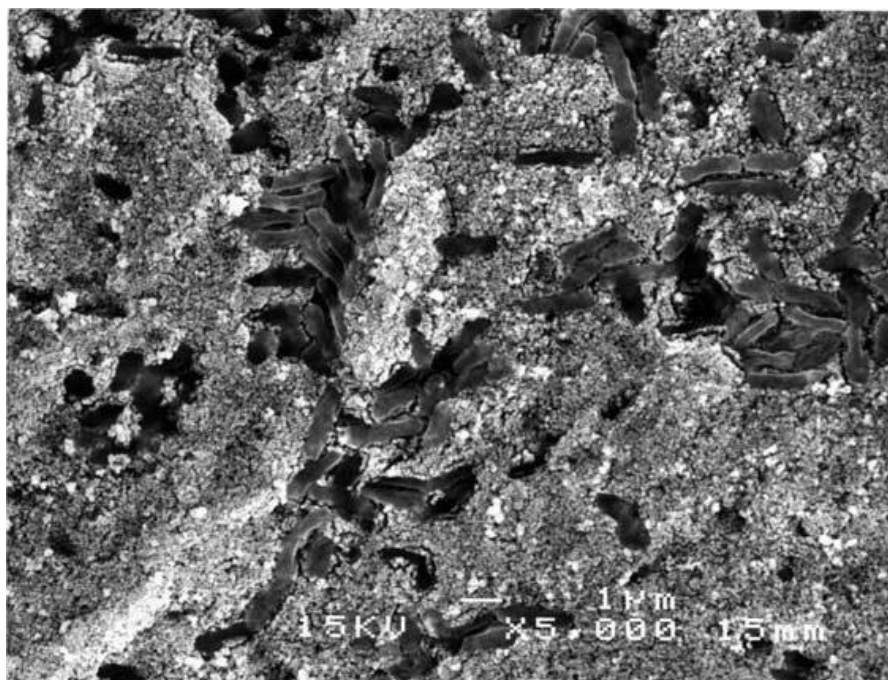


Figura 4.1 – Imagem de SEM de bactérias *E.coli* e NPs de prata.

Na imagem é possível observar células de *E. coli* rodeadas por NPs de prata agregadas. Figura adaptada de Ivan Sondi e Branka Salopek-Sondi (2004).

A observação de imagens como as da **Figura 4.1** suscita questões, tais como:

Ocorrerá a interação entre as NPs e as células? Como se deve proceder para esta análise? Com este projeto pretende-se determinar se ocorrem interações entre células e NPs, em solução. Apesar de não existir nenhuma ferramenta que permita efetuar essa análise de forma direta, em solução, a microscopia eletrónica é uma ferramenta bastante utilizada para observação direta de células e de NPs. O desafio presente está em conseguir interpretar imagens de SEM para perceber o que está acontecer em solução. Com base na imagem da **Figura 4.1**, consegue-se fazer uma previsão do que é possível observar quando se misturam células e NPs, ou seja, muito possivelmente observam-se NPs livres em excesso na amostra. A presença de NPs livres é importante para se perceber que as células tiveram efetivamente a oportunidade de estar em contacto e interagir com as NPs. No entanto, depois de essa interação ser permitida, uma separação das NPs livres em excesso na solução, pode ser extremamente útil para permitir uma subsequente observação por microscopia eletrónica adequada. A **Figura 4.2** mostra que, além de separar as NPs livres (que na imagem aparecem como uma camada espessa e rugosa sobre as células), é também necessário otimizar a concentração de células e NPs usadas na mistura durante a experiência, para que as células individuais possam ser observadas de forma mais clara no microscópio eletrónico.

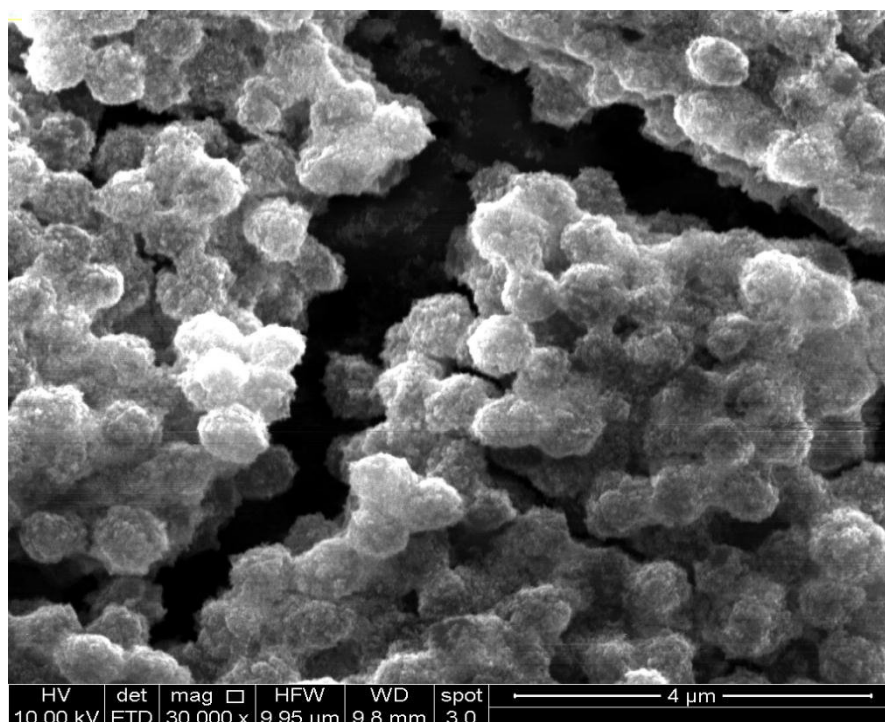


Figura 4.2 – Imagem de SEM de células de *S. aureus* revestidas com uma rugosa camada de SPIONs.

A imagem de SEM apresenta objetos esféricos com tamanho entre 500-700 nm. Os objetos esféricos são células de *S. aureus*. As células bacterianas apresentam-se revestidas com uma espessa camada de SPIONs, que não se apresentam numa resolução individual nesta escala, mas aparecem como textura rugosa. O fundo preto que se visualiza na imagem são fendas resultantes do processo de desidratação durante a preparação da amostra para análise no SEM. Figura cedida por cortesia de Cláudia Sousa (Universidade do Minho) em colaboração com Dmitri Petrovykh (INL).

Dada a dificuldade em analisar amostras da mistura de células bacterianas e NPs, a separação dos dois componentes em solução é considerada uma investigação bastante interessante mas complicada de ser otimizada.

No Capítulo 2 foi estudada a estabilidade coloidal de diferentes tipos de SPIONs em solução por centrifugação. A estabilidade coloidal das SPIONs AO-TMAOH-2 em solução de água destilada foi mantida até à velocidade de centrifugação de 6000 rpm. Consequentemente, no Capítulo 3 foi avaliada a eficiência da centrifugação para *S. aureus*, verificando-se que a centrifugação confirmou ser mais eficiente nas células de *S. aureus* acima da velocidade de 3000 rpm.

A compilação dos resultados obtidos no Capítulo 2 e no Capítulo 3 sobre a formação de *pellet* das SPIONs e das células bacterianas a diferentes velocidades de centrifugação encontra-se esquematizada na **Figura 4.3**.

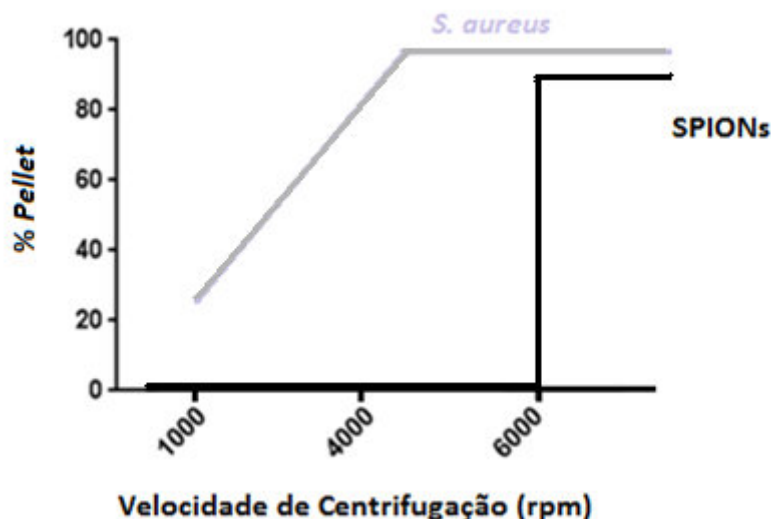


Figura 4.3 – Formação de *pellet* de células *S. aureus* e de SPIONs em função da velocidade de centrifugação (rpm). Os resultados apresentados no gráfico são referentes aos Capítulos 2 e 3. Na velocidade de 1000 rpm verifica-se pouca precipitação de células *S. aureus* (20 %); contudo, a partir de 2000 rpm verifica-se uma ligeira subida da precipitação das células até 3000 rpm (40 % a 60 %). De 4000 até 6000 rpm a quantidade de células no *pellet* mantém-se constante (valores entre os 80 % e 95 %). Relativamente à precipitação das SPIONs AO-TMAOH-2, não se verifica formação de *pellet* nas velocidades inferiores a 6000 rpm, observando-se uma precipitação abrupta das AO-TMAOH-2 à velocidade de 6000 rpm.

Uma vez conseguidos diferentes *thresholds* de velocidades de centrifugação para a formação de *pellet* para as células e para as SPIONs, é possível obter uma separação eficiente dos diferentes componentes em água destilada através da escolha de um valor intermédio de velocidade. Assim, é expectável que uma fração significativa do componente celular esteja no *pellet* e o outro componente da mistura, as SPIONs livres, permaneça em solução, no sobrenadante.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Microrganismo

Staphylococcus aureus ATCC 25923 foi o microrganismo de estudo neste projeto.

Este microrganismo foi cedido pelo Grupo de Biofilmes, IBB- *Institute for Biotechnology and Bioengineering*, CEB - *Centre of Biological Engineering* – Universidade do Minho.

4.2.2 Crescimento de *Staphylococcus aureus*

Inicialmente, as células foram crescidas em placas de TSA durante 24 h a 37 °C. Após esse período, uma colónia isolada foi transferida para 30 mL de TSB. De seguida

incubou-se a 37 °C, numa incubadora orbital (N-BIOTEK) durante um período de 18 h e com uma agitação constante de 120 rpm. Posteriormente, a suspensão celular foi lavada por centrifugação, com água destilada, duas vezes, a uma velocidade de 8000 rpm (5430 R, Fisher Scientific) durante 5 min a 4 °C. De seguida, a suspensão celular foi sonicada (Cole Parmer) de acordo com o seguinte ciclo: (20 s + 40 s) 30 % de amplitude + (40 s + 40 s) 40 % de amplitude. Finalmente, a suspensão celular foi ajustada a uma concentração final pretendida, por leitura da densidade ótica a 640 nm, num espetrofotómetro de microplacas (Tecan Sunrise).

4.2.3 Preparação da solução de SPIONs AO-TMAOH-2

A solução *stock* das SPIONs AO-TMAOH-2 foi submetida a um banho de ultrasons (Sonicor) durante 10 min de forma destruir agregados que se possam ter formado durante o tempo de armazenamento. De seguida, transferiu-se para um *Falcon* 1 mL de solução *stock* de AO-TMAOH-2 e adicionaram-se 4 mL de água destilada *vortexando-se* (BioSan) durante cerca de 60 s para permitir uma solução homogénea.

4.2.4 Preparação da Mistura: Células de *S. aureus* e AO-TMAOH-2

Inicialmente, a suspensão celular foi preparada de acordo com o descrito na subsecção 4.2.2. Para testar a melhor concentração celular a ser usada para a interação entre as células de *S. aureus* e AO-TMAOH-2 foram preparadas duas suspensões celulares com diferentes concentrações celulares iniciais, ajustadas por leitura de DO (0,40 e 0,10) a 640 nm, num espetrofotómetro de microplacas (Tecan Sunrise). Um volume de 2,5 mL de cada suspensão celular foi transferido para *Falcons* e, de seguida, o mesmo volume de solução diluída de AO-TMAOH-2 preparada como descrito na subsecção 4.2.3, foi adicionado.

A mistura de células bacterianas com AO-TMAOH-2 ocorreu durante 1 h à temperatura ambiente. De seguida, a amostra foi *vortexada* durante cerca de 60 s e preparada para a análise no SEM de acordo com a metodologia descrita na subsecção 4.2.6.

4.2.5 Protocolo de Separação de Células de *S. aureus* e AO-TMAOH-2 livres

Inicialmente procedeu-se à preparação da mistura de células bacterianas e AO-TMAOH-2 de acordo com o descrito na subsecção 4.2.4. Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada (5430 R, Fisher Scientific) à velocidade de 4000 rpm, durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido assepticamente para um novo *Falcon* e o *pellet* foi ressuspensão assepticamente em 5 mL de água destilada. De seguida, as diferentes amostras (sobrenadante e *pellet*) foram filtradas e preparadas para observação no SEM de acordo com a metodologia descrita na subsecção 4.2.6.

4.2.6 Preparação das Amostras para Observação por Microscopia Eletrónica de Varrimento

As amostras preparadas em 4.2.4 e em 4.2.5 foram filtradas através de um sistema de filtração, sendo este composto por um kitasato de vidro, suporte para filtros, mola e chaminé de filtração, previamente descontaminados, e uma bomba de vácuo (Vcuubrand 4). As amostras foram filtradas através de um filtro de polycarbonato com um diâmetro de poro de 0,20 µm (Whatman) previamente humedecido com 2 mL água destilada estéril e colocado sobre o suporte de filtração. Posteriormente, a amostra foi filtrada e as células no filtro foram fixadas com uma solução refrigerada de gluteraldeído a 2,5 %. Após 1 h de fixação das células, a solução foi filtrada e o excesso de solução de fixação foi removido por lavagem com 2 mL de água destilada durante três ciclos de 10 min.

A água destilada foi filtrada e as células desidratadas com soluções com concentrações crescentes de etanol: 10, 25, 50, 75, 90, 100 %, e por fim, repetiu-se novamente com etanol a 100 %(v/v). Cada solução de etanol foi filtrada e removida após 10 min de contacto com o filtro. Por fim, os filtros foram armazenados e secos no exsiccador.

4.2.7 Observação de Amostras por Microcopia Eletrónica de Varrimento

Cada filtro contendo as amostras foi cortado, e uma pequena porção do filtro colocada sobre fita de carbono, num suporte de amostras para SEM. O microscópio eletrónico de varrimento Quanta 650 FEG foi utilizado para as observações. As amostras foram observadas em alto vácuo (detetor de eletrões secundários ETD) e em baixo vácuo (detetor de eletrões secundários LFD), com uma voltagem de aceleração entre 10,00 kV e 20,00 kV.

4.3 Resultados e Discussão

A preparação de amostras que possibilite a observação da interação de SPIONs e de células de *S. aureus* por microscopia eletrónica foi o objetivo proposto para o presente projeto.

Preparou-se uma amostra de células de *S. aureus* com uma concentração celular inicial ajustada à DO aproximadamente de 0,40 e de seguida misturou-se a solução de AO-TMAOH-2 de acordo com o descrito na subsecção 4.2.4. O resultado desta experiência apresenta-se na **Figura 4.4**.

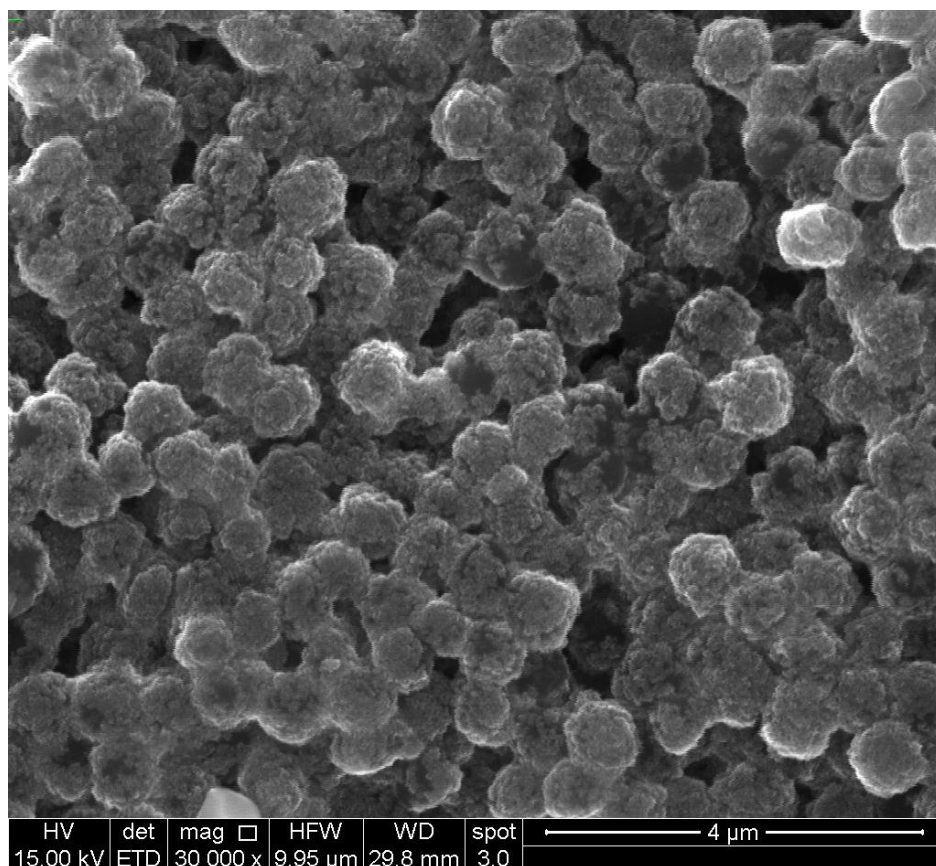


Figura 4.4 – Imagem de SEM representativa da mistura de células de *S. aureus* (concentração inicial com DO≈0,40) com SPIONs.

A imagem apresenta objetos esféricos (células de *S. aureus*) com tamanho entre 500-700 nm. As células de *S. aureus* apresentam-se cobertas com uma espessa camada de pequenas SPIONs que não se apresentam numa resolução individual nesta escala. Figura cedida por cortesia de Cláudia Sousa (Universidade do Minho) em colaboração com Dmitri Petrovykh (INL).

Na imagem da **Figura 4.4** é possível observar a deposição de uma espessa e rugosa camada de SPIONs sobre as células de *S. aureus*. Este tipo de imagens não fornece informações conclusivas. Dada a dificuldade da análise através da densa e rugosa camada de SPIONs sobre as células de *S. aureus*, foi necessário a otimização de parâmetros, nomeadamente a otimização da concentração de células usada nestes ensaios para uma melhor investigação sobre a interação entre os dois componentes por SEM.

Na **Figura 4.5** é possível observar uma imagem de SEM de uma amostra de células de *S. aureus* com concentração celular ajustada à DO aproximadamente de 0,10.

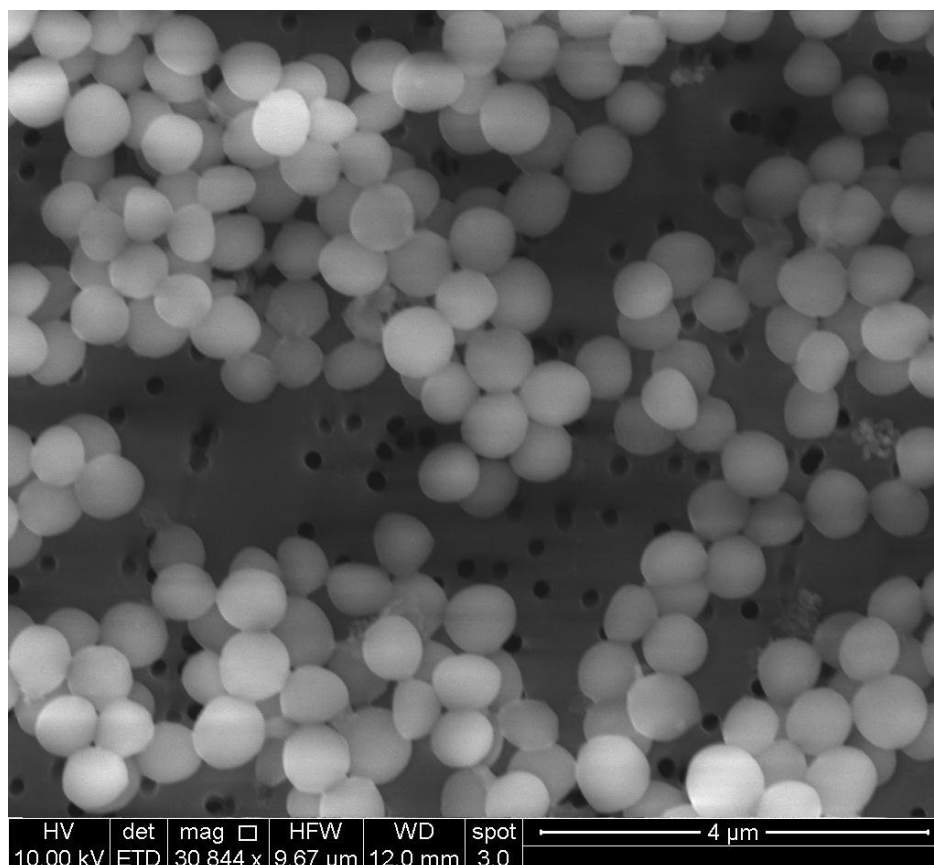
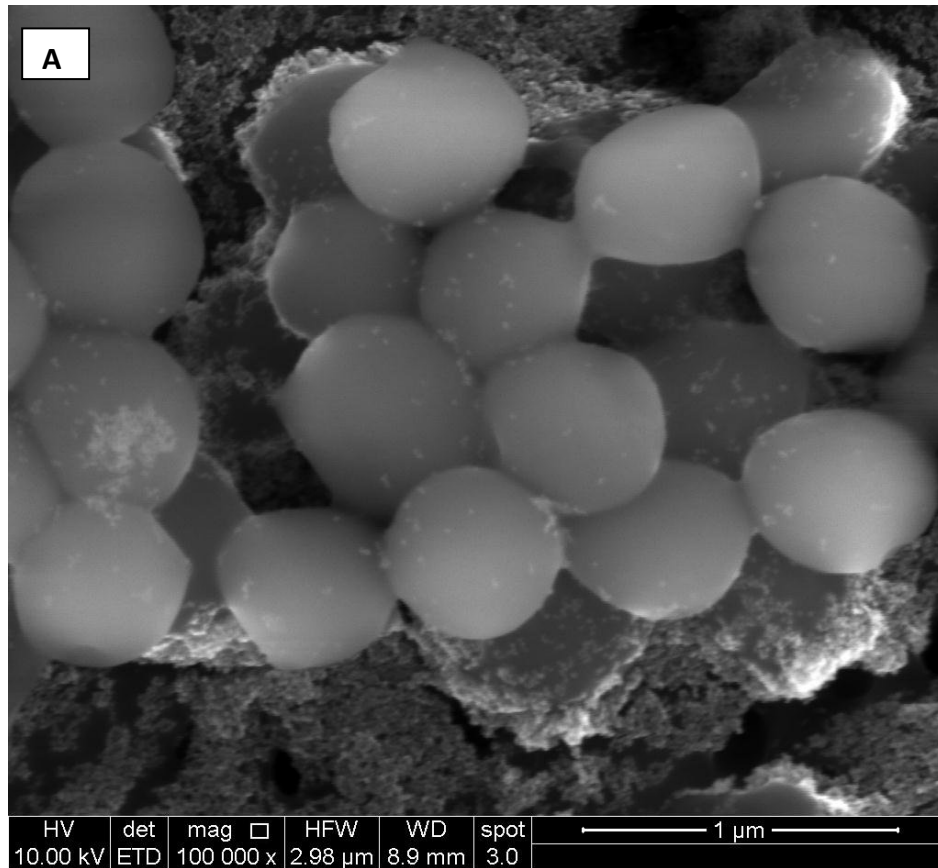


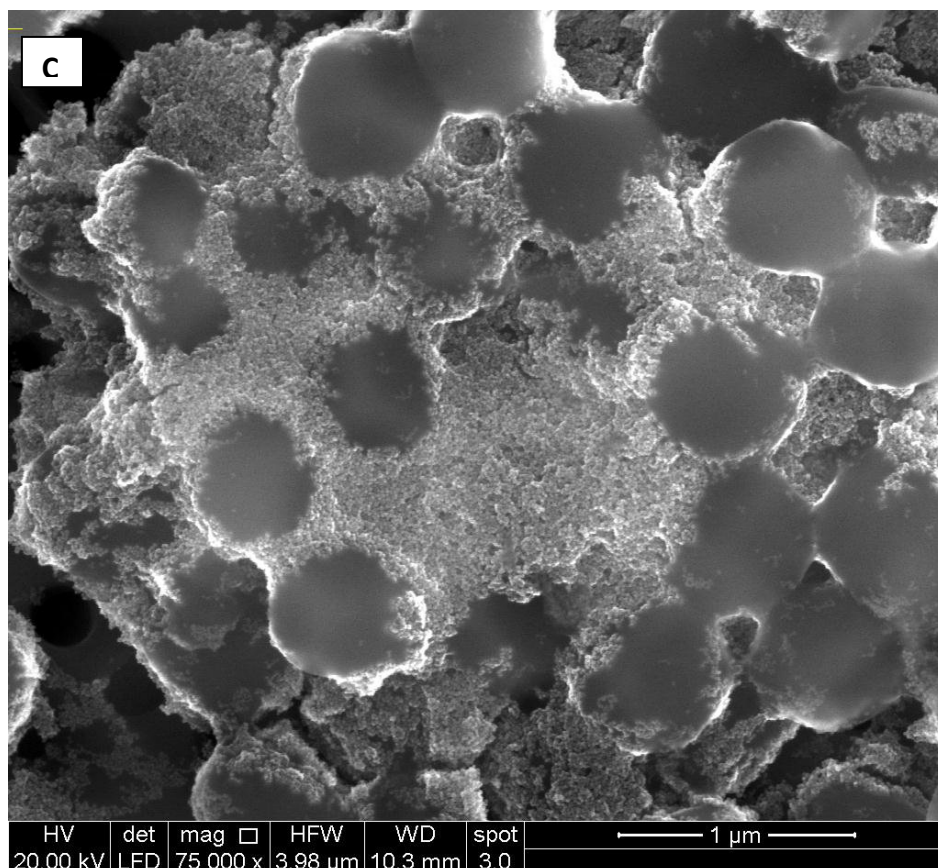
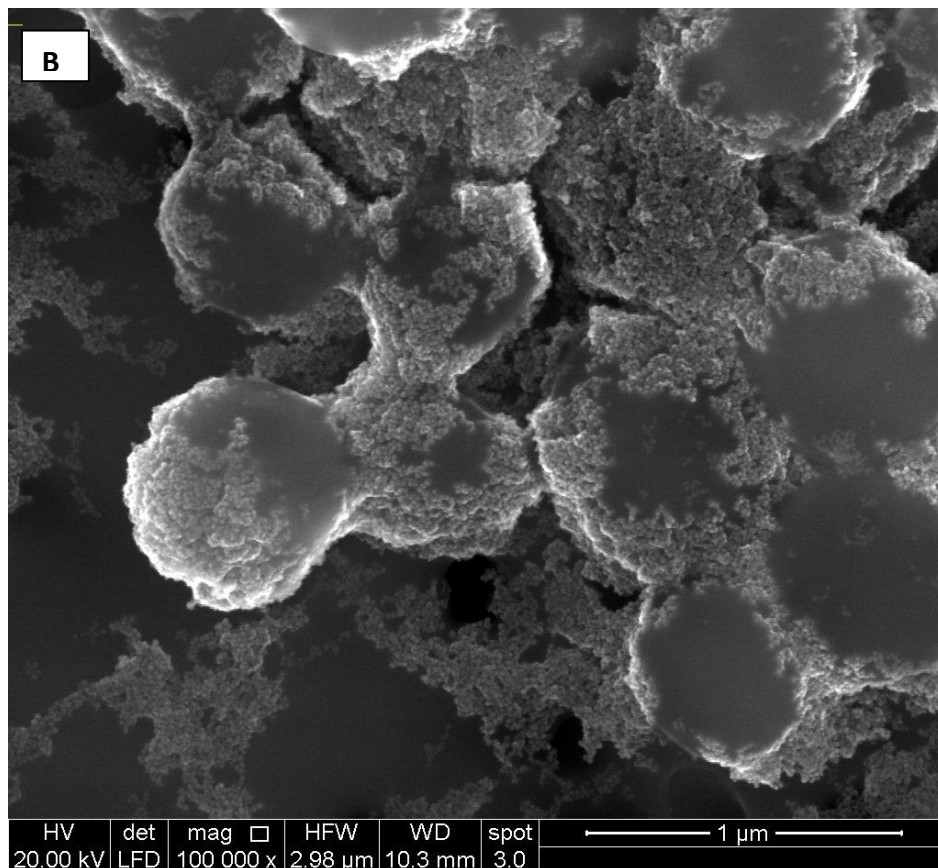
Figura 4.5 – Imagem de SEM representativa de células de *S. aureus* na concentração celular ajustada à $DO \approx 0,10$. A imagem apresenta objetos esféricos (células de *S. aureus*) com tamanho entre 500-700 nm. As células bacterianas apresentam-se com um aspeto liso e arredondado. No fundo observa-se o filtro de polycarbonato, caracterizado por uma superfície lisa e plana com poros escuros com diâmetro de 0,20 μm . Figura cedida por cortesia de Cláudia Sousa (Universidade do Minho) em colaboração com Dmitri Petrovykh (INL).

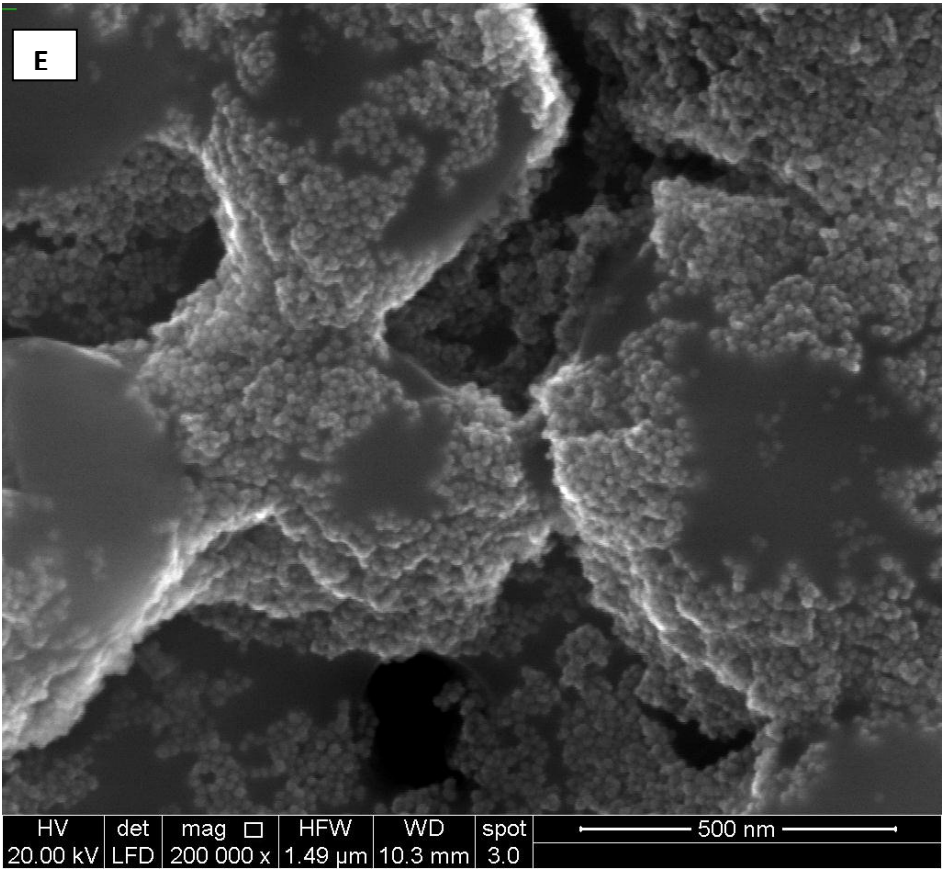
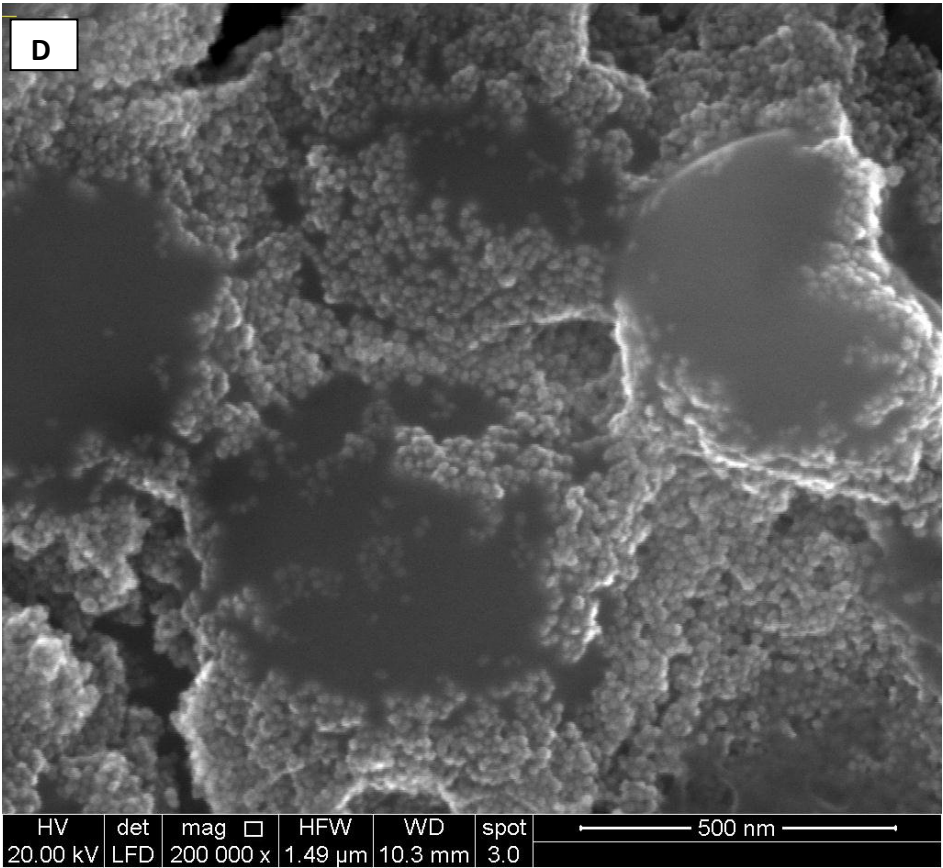
Observando a imagem da **Figura 4.5** é possível concluir que a concentração celular usada neste ensaio demonstra ser uma concentração adequada para prosseguir com os estudos da análise da interação de células bacterianas e AO-TMAOH-2. Esta concentração celular possibilita observar camadas incompletas, com 1-2 células em profundidade, sendo mesmo possível a observação do substrato (filtro de polycarbonato), ou seja, aqui não há dificuldade na observação de células individuais, como na imagem da **Figura 4.4**.

Com base nos resultados dos Capítulos anteriores, foram otimizados protocolos para o estudo da interação de SPIONs e células de *S. aureus*. Assim, o processo de centrifugação foi utilizado para a separação de células e SPIONs em solução. Como evidenciado pelos resultados do Capítulo 2, as AO-TMAOH-2 mantêm-se estáveis em água destilada nas diferentes velocidades de centrifugação até 6000 rpm. No Capítulo 3, os resultados relativos à eficiência da centrifugação nas células de *S. aureus*

mostram uma precipitação eficiente em água destilada a uma velocidade acima de 3000 rpm. A separação dos diferentes componentes em solução ocorreu, assim, por centrifugação na velocidade de 4000 rpm e é possível de ser observada através das imagens do sobrenadante na **Figura 4.6** e do *pellet* nas imagens na **Figura 4.7**.







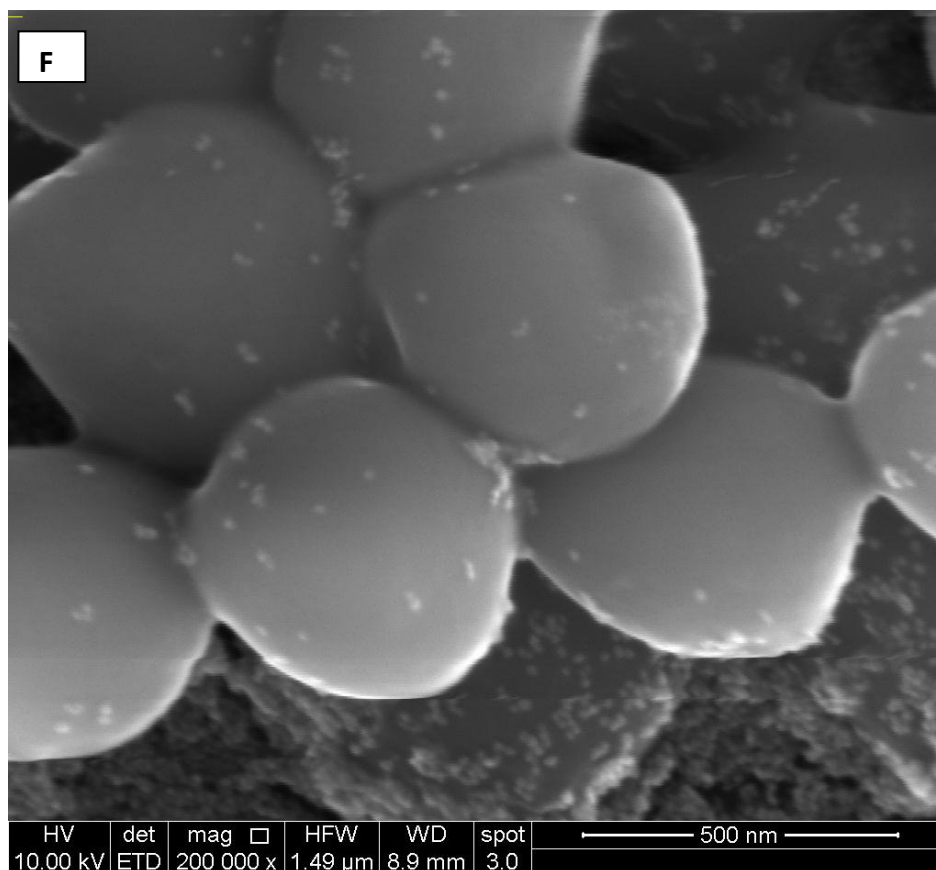


Figura 4.6 – Imagens de SEM (A,B,C,D,E e F) representativas do sobrenadante da mistura de *S. aureus* e SPIONs AO-TMAOH-2.

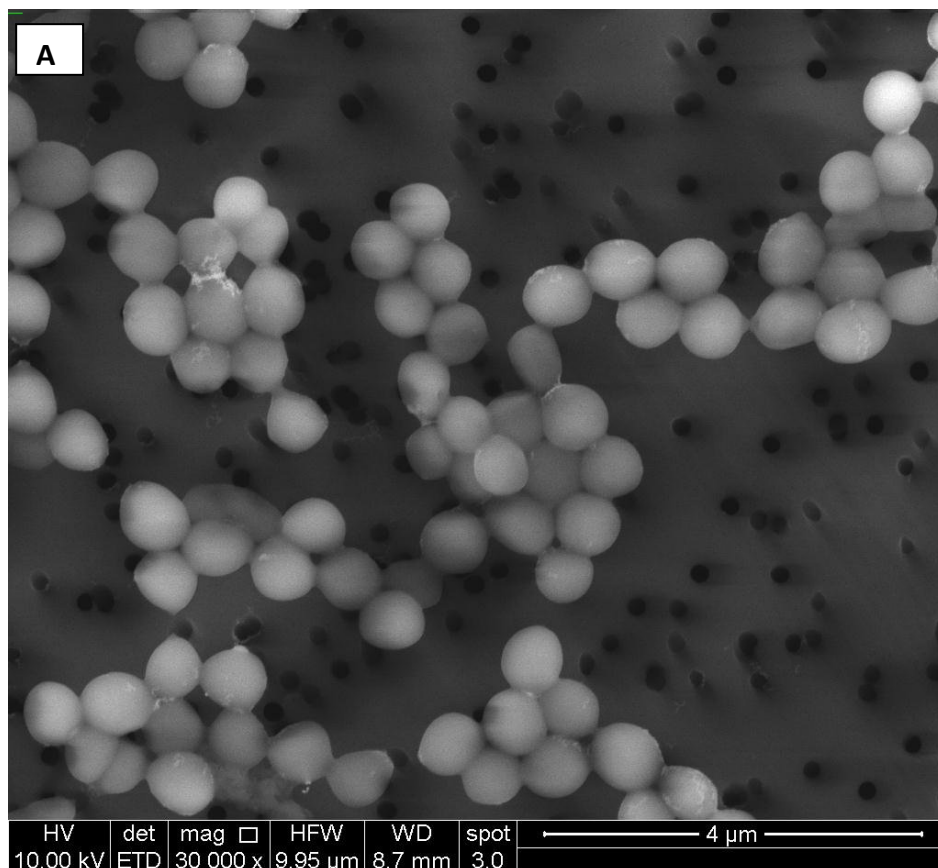
As imagens apresentam objetos esféricos (células de *S. aureus*) com tamanho entre 500-700 nm. As células bacterianas não apresentam uma superfície totalmente lisa. Os objetos mais brilhantes são as SPIONs que, em algumas imagens são observadas de forma individual e noutras em forma de agregados, tanto no filtro policarbonato como na superfície das células. Figura cedida por cortesia de Cláudia Sousa (Universidade do Minho) em colaboração com Dmitri Petrovykh (INL).

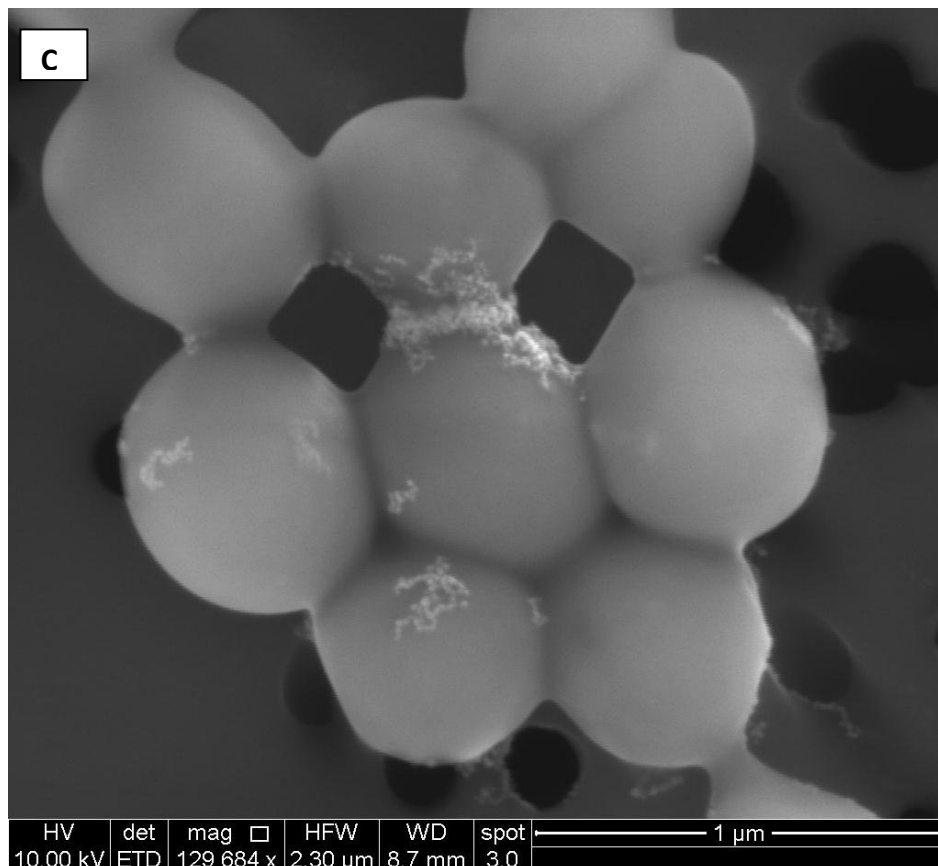
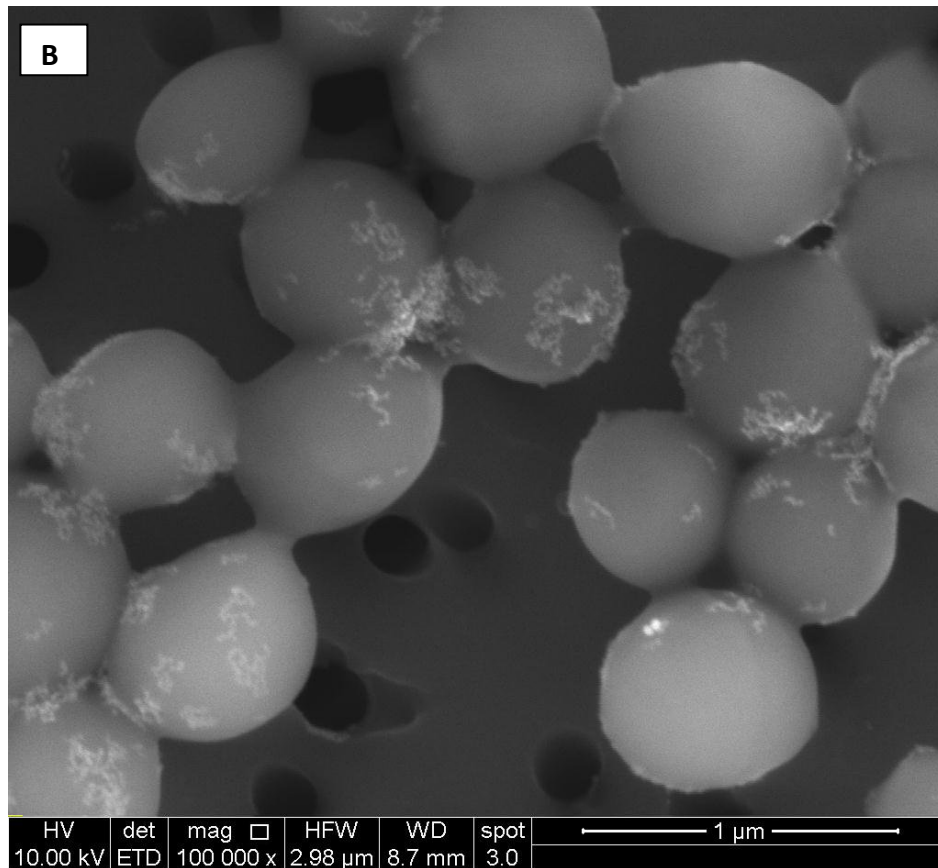
Através da observação das imagens da **Figura 4.6** é possível verificar a presença de células e muitas SPIONs livres. Este facto já era esperado, dado que a centrifugação à velocidade de 4000 rpm ou noutra velocidade não é eficiente a 100 % para permitir a sedimentação de todas as células em solução, como já foi confirmado nos resultados do Capítulo 3. A razão da escolha desta velocidade de centrifugação para a separação dos dois componentes teve por base o facto de ser uma velocidade que permite a sedimentação de quase todas as células bacterianas e não permite a sedimentação de AO-TMAOH-2 (**Figura 4.3**). Note-se que apenas com esta abordagem seria possível a separação das células com AO-TMAOH-2 livres.

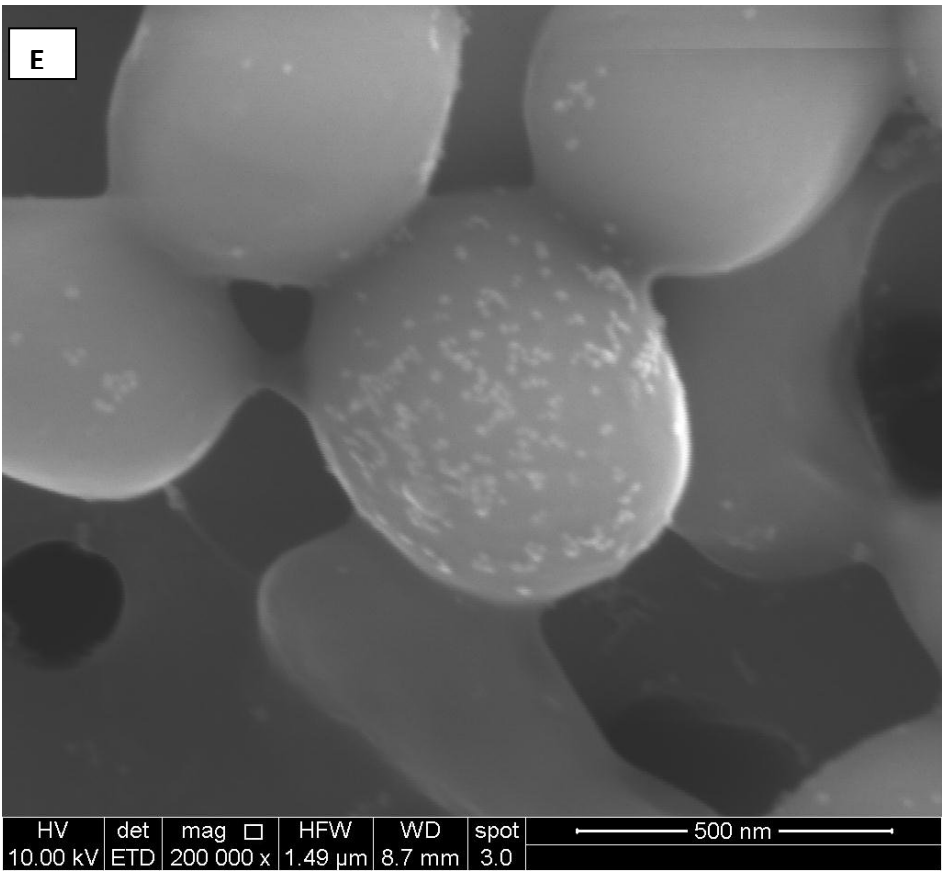
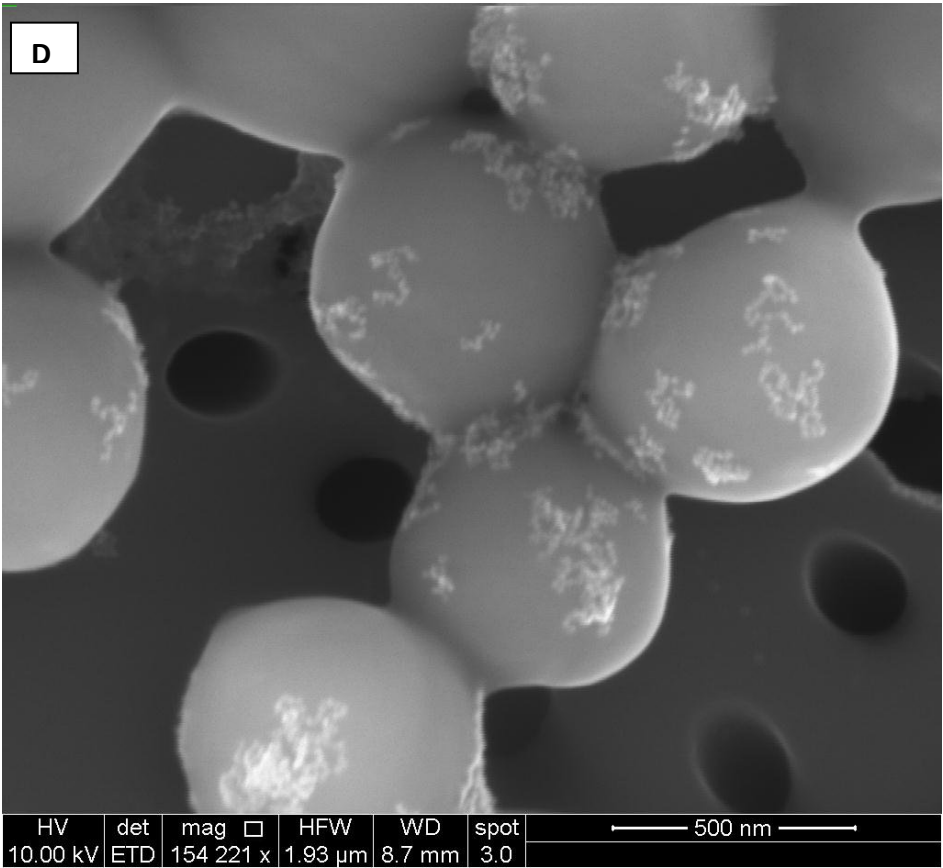
Verifica-se ainda, nas imagens da **Figura 4.6**, a agregação de SPIONs depositadas sobre as células bacterianas. Como comprovado pelos resultados do Capítulo 2, as SPIONs AO-TMAOH-2 em água destilada mantêm uma estabilidade coloidal nas

velocidades de centrifugação inferiores a 6000 rpm. Pode-se então dizer que os agregados de AO-TMAOH-2 depositadas nas células bacterianas são resultado da preparação das amostras para a observação por SEM. Caso contrário, seriam observados agregados de SPIONs nas imagens do *pellet* da mistura de SPIONs e *S. aureus* (Figura 4.7).

Na Figura 4.7 observam-se imagens de SEM do *pellet* da mistura de células e SPIONs.







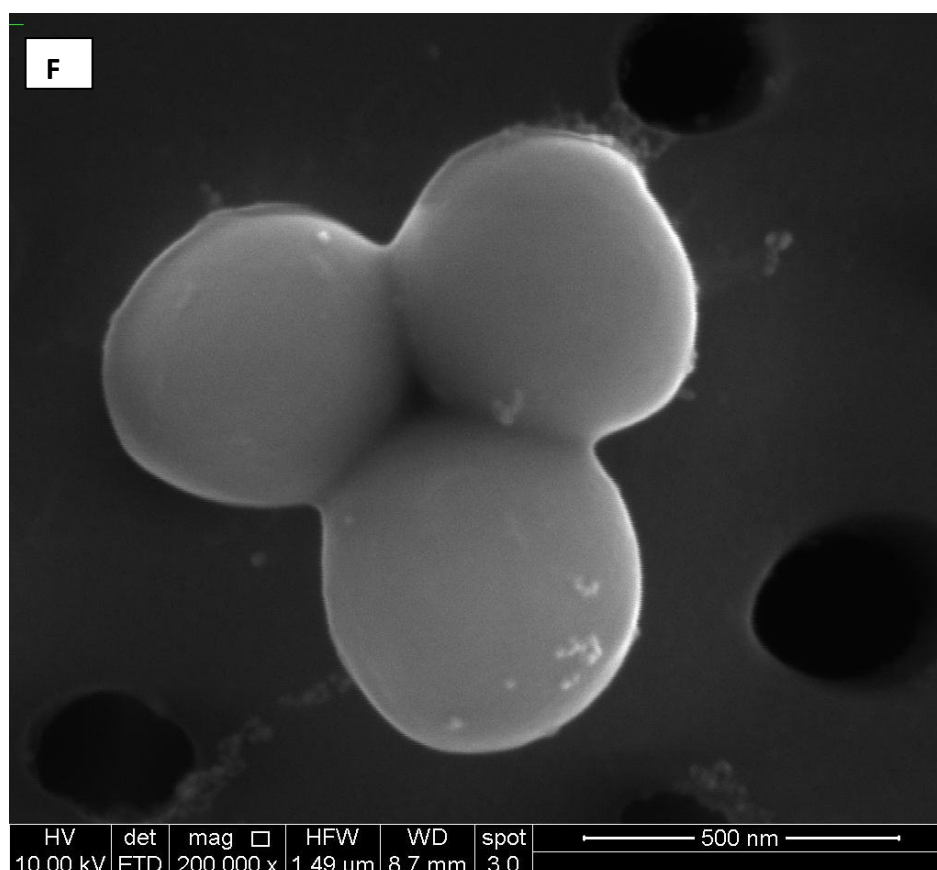


Figura 4.7 – Imagens de SEM (A,B,C,D,E e F) representativas do *pellet* da mistura de *S. aureus* e SPIONs AO-TMAOH-2.

As imagens apresentam objetos esféricos (células de *S. aureus*) com tamanho entre 500-700 nm. Nestas imagens as células têm um aspeto semelhante às células sem SPIONs (liso e arredondado). Os objetos mais brilhantes são as SPIONs que, em algumas imagens são observadas de forma individual e noutras em forma de pequenos agregados na superfície das células. Em contraste com as imagens do sobrenadante não se apresentam muitas SPIONs no substrato, isto é, o filtro de polycarbonato. O filtro apresenta uma superfície lisa e plana com poros escuros com diâmetro de 0,20 µm. Figura cedida por cortesia de Cláudia Sousa (Universidade do Minho) em colaboração com Dmitri Petrovykh (INL)

As imagens de SEM da **Figura 4.7** são relativas a amostras do *pellet* da mistura de SPIONs e *S. aureus* após centrifugação à velocidade de 4000 rpm. As imagens confirmam a presença de células bacterianas com SPIONs ligadas e poucas SPIONs livres. Conjuntamente, o resultado observado nas imagens de alta resolução do sobrenadante (**Figura 4.6**) e do *pellet* (**Figura 4.7**) permite concluir que a separação por centrifugação de células de *S. aureus* e SPIONs AO-TMAOH-2 livre em solução à velocidade de 4000 rpm foi eficaz pelo facto de quase não se observarem SPIONs livres no substrato, isto é, no filtro. De acordo com a interpretação prévia, isto significa que o processo de separação em solução originou a sedimentação de muitas células que tiveram a hipótese de interagir com as NPs, sem a sedimentação de NPs livres. Esta separação que acontece com sucesso a 4000 rpm é consistente com os resultados da

eficiência da centrifugação apresentados no Capítulo 3 e os resultados da determinação da estabilidade coloidal apresentada no Capítulo 2, respetivamente (**Figura 4.3**).

Ao contrário das AO-TMAOH-2 da **Figura 4.6**, as AO-TMAOH-2 ligadas às células bacterianas visíveis na **Figura 4.7** não são resultado da precipitação de AO-TMAOH-2 por centrifugação (tendo por base os resultados do Capítulo 3), mas o resultado da interação que ocorreu no período de 1 h de contacto entre células e AO-TMAOH-2. Se esta sedimentação tivesse ocorrido durante a centrifugação, então, como resultado todas as AO-TMAOH-2 precipitavam e não apenas algumas. Além disso, é possível observar num aglomerado de células (**Figura 4.7 - C**), algumas células bacterianas com SPIONs ligadas e em outras células não se observa nenhuma SPION ligada. Esta distribuição não uniforme das SPIONs pelas células mostra que houve interação entre ambos os componentes em solução e que não foi uma simples deposição das SPIONs sobre as células.

4.4 Conclusão

A otimização de metodologias possibilitou o desenvolvimento de um protocolo para a preparação de amostras de células de *S. aureus* e AO-TMAOH-2, por observação de evidências de interações entre NPs e células em solução, através de imagens de microscopia eletrónica de varrimento.

As principais conclusões que se podem retirar deste Capítulo são:

- 1) A otimização da concentração celular inicial de $DO \approx 0,40$ para $DO \approx 0,10$ permitiu a redução de densidade de células e a observação de células individuais.
- 2) A velocidade de centrifugação de 4000 rpm permitiu a separação de AO-TMAOH-2 livres de células em solução de forma eficiente.
- 3) Os agregados de SPIONs sobre as células bacterianas nas imagens do sobrenadante resultam da preparação da amostra para análise no SEM.

- 4) As SPIONs ligadas às células no *pellet* demonstram que a interação das AO-TMAOH-2 com as células bacterianas aconteceu durante o contacto de 1 h em solução de água destilada.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusão Geral

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação teve como objetivo principal a otimização de metodologias para o estudo de interações entre SPIONs e *S. aureus*. Para alcançar este objetivo recorreu-se inicialmente à caracterização de SPIONs e células bacterianas em separado e, posteriormente, à caracterização de amostras mistas [*S. aureus* + SPIONs].

O estudo da estabilidade coloidal de SPIONs foi importante para o estudo da posterior mistura com as células bacterianas e para a caracterização das amostras mistas. A centrifugação revelou-se um método eficiente e, para cada solução com SPIONs, verificou-se uma precipitação abrupta embora a diferentes velocidades. Este resultado permitiu confirmar a influência das propriedades físico-químicas das diferentes soluções e das diferentes SPIONs na estabilidade coloidal. O limite superior da estabilidade coloidal para as SPIONs em água destilada foi observado para AO-TMAOH-2 a 6000 rpm. Encontrado este limite de estabilidade coloidal das AO-TMAOH-2 em água destilada foi importante compreender/avaliar a viabilidade das células *S. aureus* nesta solução, dado que as soluções tradicionalmente utilizadas para o seu crescimento contêm elevada quantidade de sais. Verificou-se que a água destilada não diminui significativamente a viabilidade de *S. aureus* quando comparada com as soluções salinas, permitindo os estudos subsequentes.

Para as experiências com as SPIONs, a observação visual foi suficiente para caracterizar as suas propriedades (observação da cor e a formação de *pellet*), mas para a caracterização das células bacterianas foi fundamental usar métodos quantitativos, como o método de leitura de DO e a contagem de UFCs. A caracterização de suspensões celulares com baixas concentrações permitiu concluir que o método de contagem de UFCs não é fiável para estas amostras e que a sensibilidade do método de leitura de DO é limitada para quantificar amostras com concentrações celulares baixas. A eficiência da centrifugação nas células bacterianas foi verificada, com resultados consistentes, para concentrações celulares elevadas no intervalo de velocidades [3000 – 8000] rpm nas células de *S. aureus*. Esta conclusão é apoiada pelos valores obtidos de percentagem de *pellet* neste intervalo.

A observação/análise da amostra da mistura [*S. aureus* + SPIONs] em solução só foi possível através da interpretação resultante da observação das imagens de SEM, uma vez que não existe um método que permite a observação direta de amostras em solução. Quando se procedeu à observação das amostras iniciais da mistura por SEM não se obtiveram informações conclusivas sobre a possível interação entre as células bacterianas e as SPIONs. As imagens de SEM apresentavam uma camada espessa de SPIONs depositadas sobre as células o que dificultou a interpretação dos resultados. Esta dificuldade tem sido relatada na literatura, porém, neste estudo foi proposta a ideia da separação dos diferentes componentes na tentativa de ajudar a ultrapassar o problema. Procedeu-se à separação da mistura [*S. aureus* + SPIONs] por centrifugação tendo por base os diferentes intervalos de velocidade para a formação de *pellet* das SPIONs e das células de *S. aureus*, apresentados nos resultados dos Capítulos 2 e 3 respetivamente.

A separação foi conseguida a uma velocidade de centrifugação de 4000 rpm. Nas imagens do sobrenadante observaram-se células bacterianas, SPIONs livres e a presença de agregados de SPIONs sobre as células, sendo estes resultado da preparação da amostra para o SEM. Nas imagens de *pellet* observaram-se células bacterianas individuais com SPIONs ligadas devido à concentração celular ótima ajustada a uma $DO \approx 0,10$. Com base nos resultados dos testes de centrifugação dos Capítulos 2 e 3, pode-se concluir que as células bacterianas com SPIONs ligadas observadas nas imagens de SEM resultam do contacto com as AO-TMAOH-2 em solução. Além do mais, uma distribuição não uniforme das SPIONs ligadas às células bacterianas confirma a existência de interação entre ambos os componentes em solução e não uma simples deposição ou precipitação das SPIONs sobre as células bacterianas.

5.2 Contexto e Relevância dos Resultados

No decorrer deste projeto foi importante compreender/observar a interação das SPIONs com células *S. aureus* por microscopia eletrónica. Esta observação permitiu fornecer evidências de como SPIONs interagem com as células bacterianas, em solução. Segundo os resultados dos diferentes tipos de SPIONs testadas foi possível

compreender quais as propriedades das SPIONs importantes para controlar as interações [*S. aureus* + SPIONs].

O método desenvolvido para a preparação de amostras de NPs que interagem com as células bacterianas devem ser aplicáveis a outros tipos de NPs, porque a separação é baseada nas diferenças de estabilidade coloidal de NPs e na precipitação das células bacterianas. Para a maioria das NPs a serem misturadas com células bacterianas, é possível desenvolver um protocolo semelhante, porque a estabilidade coloidal das SPIONs em suspensão varia de acordo com diferentes parâmetros, nomeadamente as propriedades da solução e das SPIONs, concentração de sais em solução, revestimento da superfície da NP e o surfactante utilizado.

É bem conhecida na literatura a viabilidade celular de *S. aureus* em soluções contendo elevadas concentrações de sais. Pelos resultados obtidos na avaliação da viabilidade celular de *S. aureus* em água destilada, pelo método de contagem de UFCs, a água destilada não diminui fortemente a viabilidade de *S. aureus* quando comparada com as soluções salinas. Este método é geralmente considerado um método de referência, mas foi compreendido que para baixas concentrações celulares não produz contagens fiáveis. Isto deve-se provavelmente ao facto de que o método de contagem de UFCs não consegue controlar a média de agregados celulares numa amostra como descrito nos resultados do Capítulo 3 (subsecção 3.3.1 e 3.3.2).

Por último, a centrifugação é uma prática muito comum para a compactação de bactérias em solução. Normalmente são usadas velocidades elevadas de centrifugação para essa compactação, mas na literatura não é explicada a razão para a escolha de um valor em particular, assumindo que não causam qualquer dano celular ou morte celular bacteriana. Porém, no decorrer deste projeto foram obtidos resultados que comprovam estatisticamente que não são necessárias elevadas velocidades de centrifugação para recolher o maior número de células de *S. aureus* conseguindo, desta forma, alcançar o objetivo do presente projeto.

5.3 Sugestões para Trabalhos Futuros

Com base nos resultados obtidos na realização deste projeto, e no sentido de melhorar algumas dificuldades encontradas, seriam importantes sugestões para futuros trabalhos de investigação com base nos resultados referidos na subsecção 5.2.

- 1) Desenvolver um protocolo para a análise da interação de células *S. aureus* com outro tipo de NP, sem ser SPIONs, utilizando a mesma abordagem deste projeto. Seria também muito interessante o estudo da interação de SPIONs com outras células bacterianas, dado que para ambas as sugestões seria apenas necessário estudar um dos componentes.
- 2) Segundo descrito na literatura, a viabilidade celular bacteriana não é muito compreendida em água, porém, neste projeto foram conseguidos resultados que confirmam que viabilidade de *S. aureus* em água destilada não é significativamente afetada até 24 h. Seria importante avaliar a viabilidade celular de *S. aureus* em água destilada com um maior grau de certeza e por períodos superiores a 24 h.
- 3) Segundo a literatura, os investigadores selecionam velocidades elevadas de centrifugação para recolher o maior número de células bacterianas assumindo que não causam qualquer dano celular ou morte celular bacteriana. Com base no estudo e nos resultados apresentados no Capítulo 3 foi confirmado que não é necessária a utilização de elevadas velocidades de centrifugação (por exemplo, 8000 rpm) para obter um valor razoável de *pellet* de células de *S. aureus*. No entanto seria bastante interessante avaliar a viabilidade celular de *S. aureus* após a centrifugação da amostra a diferentes velocidades de centrifugação.
- 4) Com base nas dificuldades encontradas no decorrer deste projeto para conseguir um método sensível para determinar a eficiência da centrifugação para concentrações celulares baixas, seria importante a comparação dos diferentes métodos (DO e UFCs) para concentrações celulares elevadas (por

exemplo, $DO \approx 0,60$). Isto porque pelos resultados obtidos neste trabalho, foi confirmado que pelo menos com o método de leitura de DO é possível obter resultados confiáveis para concentrações celulares elevadas.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- Abrantes, P.M. (2003).** *Estudo da prescrição de antibacterianos de uso sistêmico em unidades da Gerência de Saúde Centro Sul (GERSA CS) - Belo Horizonte - MG.* Belo Horizonte: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFMG, Tese.
- Alexandre, A., Peter S.T., & Warren, C.W. C. (2012).** The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu. Rev. Biomed.* 14:1–16.
- Allan, I. & Pearce, J.H. (1979).** Modulation by centrifugation of cell susceptibility to chlamydial infection. *J. Gen. Microbiol.* 111:87–92.
- Archer G. (1998).** *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clinical infectious diseases* 26:1179–1181.
- Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., Baldassarri L. & Montanaro L. (2005).** Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. *FEMS Microbiol Lett.* 246:81-86.
- Assis, A. R. (2007).** Estudo de *Mycobacterium phlei* (ATCC 11758) como agente agregante para hematita e quartzo. Belo Horizonte, Tese.
- Breed, Robert, S. & Dotterrer, W. D. (1916).** The Number of Colonies Allowable on Satisfactory Agar Plates". *Journal of Bacteriology* 1: 321–331.
- Beers, M., Fletcher, A., Jones T., Porter R., Berkwits, M & Kaplan, J. (2008).** Manual Merck de Informação Médica – Edição Ampliada e Atualizada. *Editorial Oceano.* Barcelona, Espanha.
- Bergmans, L., Moisiadis, P., Van Meerbeek B., Quirynen M. & Lambrechts P. (2005).** Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *International Endodontic Journal*, 38, 775–788.
- Boulange-Petermann, L., Robine E., Ritoux S. & Cromieres B. (2004).** Kinetics of bacterial survival on polymer coatings with particular reference to indoor air quality. *Biofouling*; 20:203–10.
- Camargo, L.F., Marra, A.R., Büchele, G.L., Sogayar, A.M., Cal, R.G., Sousa, J.M., Silva, E., Knobel, E., Edmond, M.B. (2009).** Double-lumen central venous catheters impregnated with chlorhexidine and silver sulfadiazine to prevent catheter colonisation in the intensive care unit setting: a prospective randomised study. *J Hosp Infect.* 72:227 – 233.
- Campoccia, D., Montanaro, L. Arciola, C. R. (2009).** Current methods for molecular epidemiology studies of implant infections. *Int J Artif Organs* 32 (9): 642–54.

Cepeda, J. A., Whitehouse, T., Cooper, B., Hails, J., Jones, K., Kwaku, F., Taylor, L. & Shaw, S. (2005). Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two center study. *The Lancet*, 365 (9456): 295–304.

Chang, H.T. & Rittmann, B. E. (1986). Biofilm loss during sample preparation for Scanning Electron Microscopy. *Res.* 20 (11): 1451–1456.

Chapman, J. H. (1945). Significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J. Bacteriol.* 50:201–203.

Chekli, L., Phuntsho, S., Roy M., Lombi, E., Donner, E. & Shon H. (2013). Assessing the aggregation behaviour of iron oxide nanoparticles under relevant environmental conditions using a multi-method approach *water research*. 47: 4585–4599.

Cheung, A. L., Bayer, A.S., Zhang, G. Gresham, H. & Xiong, Y.Q. (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *Fems immunology and Medical Microbiology*. 40 (1): 1–9.

Cirtiu, C.M., Raychoudhury, T. Ghoshal, S. & Moores, A. (2011). Systematic comparison of the size, surface characteristics and colloidal stability of zero valent iron nanoparticles pre- and post-grafted with common polymers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, In Press*. 09:011.

Cleare, W. & Casadevall, A. (1999). Scanning electron microscopy of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans* and the effect of glucose on capsular polysaccharide release. *Med. Mycol.* 37: 235–243.

Costa, E. (2009). Actividade antimicrobiana de dois extractos vegetais contra *S. aureus*. Tese de Mestrado. Portugal

Davey M.E. & O' Toole G.A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *American Society for Microbiology*. 64: 847–867.

DeFlaun, M.F., Levy, S.B., Levy S.B. & Miller, R.V. (1989). Genes and their varied hosts. In: Eds. Gene transfer in the environment. *McGraw Hill Publishing*. 1–32

Deupree, S. M. & Schoenfisch, M.H. (2008). Quantitative method for determining the lateral strength of bacterial adhesion and application for characterizing adhesion kinetics. *Langmuir* 24: 4700– 4707.

Domingos, R.F. & Baalousha, M.A. (2009). Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. *Environmental Science and Technology* 43: 7277–728.

Donlan, R. M. Biofilms and Device-Associated Infections. (2001). *Emerging Infectious Disease Journal*, 7, 277–280.

Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167–93.

Donskey, C.J. (2004). The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis*; 39:219–26.

Dzidic, S., Suskovic, J. & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: *Biochemical and Genetic Aspects. Food Technology Biotechnology.* 46:11–21.

Farmer J. (2003). Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. Manual of Clinical Microbiology. *American Society for Microbiology Press.* 8: 636 –653.

Fauci, A.S. (2001). Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin. Inf. Dis.* 32: 675–85.

Ferreira & Sousa (2000). Microbiologia. *Edições Lidel.* Lisboa.

Fux, C.A., Costerton J.W, Stewart P.S. & Stoodley P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.*13:34–40.

Gordon R. e Lowy F. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical infectious diseases.* 46: S350–S359.

Gupta, A.K. & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 26(18):3995-4021.

Guterres, S. S., Fessi, H., Barratt, G., Devissaguet, J-Ph. & Puisieux, F. (1995). Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study, *International Journal of Pharmaceutical*, Amsterdam. 113: 57–63.

Harris, L. G. Foster, S. J. & Richards, R. G. (2002). An Introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cell and Materials.*4: 39–60.

He, F. & Zhao, D. (2007). Stabilization of FePd nanoparticles with sodium carboxymethyl cellulose for enhanced transport and dechlorination of trichloroethylene in soil and groundwater. *Industrial and Engineering Chemistry Research.* 46 (1): 29–34.

Henglein, A. (1989). Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles. *Chem. Rev.* 89: 1861–1873.

Hill, H. W. (1908). The Mathematics of the Bacteria Count. *Amer. Jour. Pub. Hyg.* 18: 400–310.

Hirai, Y. (1991). Survival of bacteria under dry conditions from a viewpoint of nosocomial infection. *J Hosp Infect.* 19:191–200.

Horák D., Babic M., Mackova H. & Benes M.J. (2007). Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *J Sep Sci.* 30: 1751–72.

Iva, S. & Branka, S. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science.* 275:177–182.

Jain, D., Banerjee, R. (2008). Comparison of ciprofloxacin hydrochloride-loaded protein, lipid, and chitosan nanoparticles for drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res. B*, 86:105–12.

Jeffree, C. E. & Read, N. D. (1991). Ambient and Low-temperature scanning electron microscopy. In Hall, Hawes. *Electron Microscopy of Plant Cells*. London. Academic Press. 313–413.

Jin, H., J. Nam, J. Park, S. Jung, K. Im, J. Hur, J. J. Park, J.M. & Kim, S. K. (2011). Strong polyelectrolyte quantum dot surface for stable bioconjugation and layer-by-layer assembly applications, *Chem. Commun.* 47:1758–1760.

Jordan, A. Scholz, R., Maier-Hauff, K. Johannsen, M., Wust, P., Nadobny, J., Schirra, H., Schmidt, H., Deger, S., Loening, S., Lanksch, W., Felix, R. (2001). Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* 225 (1–2): 118–126.

Josiane, F., Walquíria, A., Augusto, S. & Marilene, H. (2006). An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analysis. *Journal of Microbiological Methods.* 64:416 – 419.

Kaivosoja, E., S. Virtanen, R. Rautema, R. Lappalainen & Y.T. Konttinen, (2012). Spectroscopy in the analysis of Bacterial and Eukaryotic Cell Footprints on implant surfaces. *European Cells and Materials.* 24: 60–73.

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology.* 27:137A.

Kloos, W.E. & Bannerman, T.L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 7: 117–140.

Kim, J.S., Kuk E.; Yu, K.N., Kim J.H., Park, S.J., Lee, H.J. Kim, S.H.; Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H. & Cho M.H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med.* 3: 95–101.

Kniehl, E., Becker, A. & Forster, D.H. (2005). Bed, bath and beyond: pitfalls in prompt eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrier status in healthcare workers. *Journal of Hospital Infection.* 59(3): 180–187.

- Koch, G. F. E. (1942).** Electivnahrboden fur Staphylokokken. Zentr. Bakteriol. Parasitenk. *Abt. I Orig.* 149:122–124.
- Kiernan, J. A. (2000).** Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today* (1):8–12.
- Kramer, A., Schwebke I. & Kamp, G. (2006).** How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 6:130.
- Kumon, H., Hashimoto, H., Nishimura, M., Monden, K., Ono, N. (2001).** Catheter-associated urinary tract infections: impact of catheter materials on their management. *Int J Antimicrob Agents.* 17:311–316.
- Krishna, R., Raghupathi R. T. & Koodali A. C. M (2011).** Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles *Langmuir.* 27:4020–4028.
- Kunin, C.M., K.S Johansen, A.M. Worning & F.D. Daschner. (1990).** Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. *Rev. Infect. Dis.* 12: 12-8.
- Laurent, S., Dutz, S., Häfali, U. O.& Mahmoudi, M. (2011).** Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166, 8-23.
- Lead, J.R., Wilkinson, K.J. (2006).** Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends. *Environmental Chemistry* 3 (3): 159–171.
- Liao, C., Shollenberger, L.M. (2003).** Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology.* 37: 45–50.
- Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S. & Sen, T. (2011).** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advances Drug Delivery Reviews*, 63: 24–46.
- Marques, D.C. & Zucchi. P. (2006).** Comissões farmacoterapêuticas no Brasil: aquém das diretrizes internacionais. *Salud Publica Rev. Panam.* 19: 58-63
- Martins P. (2011).** Produção e caraterização de nanopartículas magnéticas para aplicação biotecnológica. Universidade do Minho. Portugal. Tese de Mestrado.
- Mendes J. (2010).** *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance: from basic research to clinical practice. *Rev Port Med Int:* 17(1).
- Milkhaik, V. B., Kraus, H., Kapustyanyk, V., Panasyuk, M., Prots, Y., Tsybukskyi, V., Vasylechko, L. (2008).** Structure, luminescence and scintillation properties of the MgWO₄–MgMoO₄ system. *J. Phys.:Condens. Matter.* 20.
- Milner, S. T. (1991).** Polymer Brushes. *Science* 251:4996.

Mizunoe, Y., Wai, SN, Yshikawa, T., Takade, A, & Yoshida, S. (2000). Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature understarvation. *FEMS Microbiol Lett* . 186:115–20.

Mohammad, F., Balaji, G., Weber A., Uppu R.M., Kumar, C.S.S.R. (2010). Influence of Gold Nanoshell on Hyperthermia of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem.* 114:94–19201.

Morones, J.R., Elechiguerra, J.L.; Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T. & Yacaman M.J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16:2346–2353.

Nam, J., Won, N., Ho, B., Joonhyuck, P., Sungwook, P., Sanghwa, J., Park, Y. & Kim J. (2012). *Advanced Drug Delivery. Reviews* 65: 622–648.,

Neuberger, T., Scho, B., Hofmann, H., Hofmann, M. & Rechenberg, B. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* 293 (1): 483–496.

Norrby, R., Nord, C.E. & Finch, R. (2005). Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect. Dis.* 5: 1159.

Nosanchuk, J.D., Cleare, W., Franzot, S.P. & Casadevall, A. (1999). Amphotericin B and Fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytosis, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at sub inhibitory concentrations. *Antimicrob.Agents Chemother.* 43 (2), 233–239.

Ogawa, M., K. Tani, N. Yamaguchi, & M. Nasu. (2003). Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water. *J. Appl. Microbiol.* 95:120–128.

Opas. (1999). Organización Panamericana de La Salud. La resistencia a antimicrobianos en las Américas. *Rev. Panam. Salud Publica.* 6: 437–9.

Parfentjev, I. A. & Catelli. A. R. (1963). Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *Bacteriol. Proc.*161.

Park, H., Park,H., Kim, J., Lee, S., Kim, J. H., Yoon, J. & Park, T.(2011). Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilms by hyperthermia using superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Microbiological Method:* 41-45.

Poortinga, A.T., Bos, R., Norde, W. & Busscher, H.J. (2002). Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surf Sci Rep.*2002;47:1–32.

Price, C.L., Williams, D.W., Waters, M.G., Coulthwaite, L., Verran, J., Taylor, R.L. (2005). Stickler D, Lewis MA. Reduced adherence of *Candida* to silane-treated silicone rubber. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;74:481-487.

Ravishankar, A.C. Priya, G. & Hiremath, S.V. (2011). Effect of ciprofloxacin acute and subacute inflammation in wistar rats. *Pharmacologyonline* 3: 729–735.

Rice, L. & Bonomo, R. (2005). Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5: 441–476.

Rodrigues, D., Banobre-Lopes, M., Espiña, B., Rivas, J., Azeredo, J. (2012). Control of planktonic bacterial cells and biofilms through magnetic hyperthermia. Poster apresentado numa conferência: Biofilms 5
http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/23908?mode=full&submit_simple=Mostrar+registo+em+formato+completo. Universidade do Minho. Portugal

Romaní, A.M., Fund, K., Artigas, J., Schwartz, T., Sabater, S. & Obst, U. (2008). Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microb. Ecol.* 56:427–436.

Roucoux, A., Schulz, J. & Patin, H. (2002). Reduced transition metal colloids: A novel family of reusable catalysts. *Chemical Reviews*. 102:3757 – 3758.

Russell, S. D., Daghlia, C. P. (1985). Scanning electron microscopic observations on deembedded biological tissue sections: Comparison of different fixatives and embedding materials. *Journal of Electron Microscopy Technique* 2 (5):489 – 495.

Russel, W.B, Saville, D.A. & Schowalter, W.R. (1989). Colloidal Dispersions. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK.394 – 428.

Saez, M., Guzman, M., Molpeceres, J. & Aberturas, M. R. (2000). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 379.

Saleh, N., Phenrat, T. (2005). Adsorbed triblock copolymers deliver reactive iron nanoparticles to the oil/water interface. *Nano Letters*. 5(12): 2489 – 2494.

Salgueiriço-Maceira, V., Miguel, A., Correa - Duarte & Michael, F. (2004). Manipulation of Chemically Synthesized FePt Nanoparticles in Water: Core–Shell Silica/FePt Nanocomposites *Langmuir*. 20, 6946–6950.

Santos, A. (2001). O tamanho das Partículas de poeira suspensas no ar dos ambientes de trabalho. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Schaffazick, S. R. & Sílvia, G. (2003). Physicochemical characterization and stability of the polymer nanoparticles systems for drug administration. *Quim. Nov.*, 26(5): 726–737.

Schrick, B. & Hydutsky, B.W. (2004). Delivery vehicles for zerovalent metal nanoparticles in soil and groundwater. *Chemistry of Materials* 16 (11): 2187–2193.

Shinefield, H. & Ruff, N. (2009). Staphylococcal infections: A historical prospective. *Infectious Disease Clinics of North America*. 23:1–15.

Simor, A. & Daneman, N. (2009). *Staphylococcus aureus* decolonization as a prevention strategy” *Infectious Disease Clinics of North America*. 23:134–151.

Sirk, K.M., Saleh, N.B. (2009). Effect of adsorbed polyelectrolytes on nanoscale zero valent iron particle attachment to soil surface models. *Environmental Science and Technology* 43 (10): 3803–3808.

Smith, I. M. (1958). Staphylococcus infections. Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago.

Sousa, C., Henriques, M. & Oliveira R. (2011). Mini-review: Antimicrobial central venous catheters – recent advances and strategies. *Biofouling*. 27(6):609–620.

Sousa, C., Botelho, C. & Oliveira, R. (2011). Nanotechnology applied to medical biofilms control. *Research and technological advances*. 878–888.

Spanhel, L., Haase, M., Weller H. & Henglein, A. (1987). Photochemistry of colloidal semiconductors. Surface modification and stability of strong luminescing CdS Particles. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 5649–5655.

Subbiahdoss, G. Sharifi, S., Grijpma, D.W., Laurent, S., van der Mei, H.C., Mahmoudi, M. & Busscher, H.J. (2012). Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant staphylococci. *Elsevier*. 8: 2047–2055.

Svedberg, T., Pederson, K.O. (1940). The Ultracentrifuge. *Oxford Univ Press*, London, 6(66): 212–214.

Tani, K., J. M. Chen, N. Yamaguchi, and M. Nasu. (1996). Estimation of bacterial biovolume and biomass by scanning electron microscopic image analysis. *Microb. Environ.* 1:11–17.

Tavares, W. (1999). Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. São Paulo: Atheneu.

Taylor, E.N. & Webster, T.J. (2009). The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention. *Int J Nanomed.* 4:145–52.

Tenover, F.C., Hughes, J.M. (1996). The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA*, 275: 300–304.

Tenover, F. (2001). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection and Control*. 34(5): S3–S10.

Todar, K. (2012). Bacterial Resistance to Antibiotics. em *Todar's Online Textbook of Bacteriology*.

Van der Mei, H. C., Rustema-Abbing, M., Vries, J. & Busscher, H. J. (2008). Bond strengthening in oral bacterial adhesion to salivary conditioning films. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5511–5515.

Vats, N. & Lee, S. F. (2000). Active detachment of *Streptococcus mutans* cells adhered to epon-hydroxylapatite surfaces coated with salivary proteins in vitro. *Arch. Oral Biol.* 45:305–314.

Veenstra, D. L., Chaikunapruk, N., Lipsky, B. A. & Saint S. (2002). Chlorhexidine compared with povidone-iodine solution for vascular catheter-site care: a meta-analysis. *Ann Intern Med.* 136:792 – 801.

Veiga. (1984). Os antibióticos na prática clínica. *Infecon*. Lisboa

Vivek, S., Kyoungweon, P. & Mohan S. (2009). Shape separation of gold nanorods using centrifugation. *PNAS* .106 (13):4981–4985

Von Eiff, C., Jansen, B., Kohnen, W. & Becker, K. (2005). Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs*.65: 179–214.

Zhang, W., Wang, C.B. (1998). Treatment of chlorinated organic contaminants with nanoscale bimetallic particles. *Catalysis Today* 40 (4): 387–395.